



**Maria Fátima da
Fonseca**

**Sobreexpressão e purificação da carbapenemase
SFC-1 produzida por um isolado de *Serratia fonticola***



**Maria Fátima da
Fonseca**

**Sobreexpressão e purificação da carbapenemase
SFC-1 produzida por um isolado de *Serratia fonticola***

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Dr. António Carlos Matias Correia, Professor Associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT e do FSE no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio, através da Bolsa de Mestrado SFRH/BM/13342/2003.

o júri

presidente

Prof. Dra. Maria Paula Polónia Gonçalves
professora associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dra. Maria Aida Costa e Silva da C. Duarte
professora auxiliar com agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Prof. Dr. António Carlos Matias Correia
professor associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dra. Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de apresentar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram, de forma diversa, para a realização deste trabalho.

Ao Dr. António Correia, orientador científico desta dissertação, pelo seu constante incentivo e optimismo contagiante, mesmo nos momentos de maior dificuldade.

À Dra. Maria José Saavedra pela sua colaboração e disponibilidade.

A todos os colegas de laboratório e amigos pela ajuda na realização do trabalho prático, mas também pelo agradável ambiente de trabalho. Obrigada Marta, Artur, Alexandra, Cláudia, Anabela e Sofia.

À Isabel, pela sua disponibilidade permanente, pelo seu interesse neste trabalho, e, não menos importante, pelo carinho e ajuda prestada nos momentos mais difíceis.

À Cristina, por me ter iniciado ao estudo das proteínas e pela forma empenhada com que se envolveu neste trabalho, sem a qual este não teria sido possível. Obrigada também pela amizade demonstrada.

A todos os meus amigos, especialmente à Sara, Dina, Eduardo e Salomé, pelos momentos de diversão, pela sua atenção e carinho. Um obrigado especial à Helena, pela sua amizade e incentivo.

À minha família, pai, irmãos, sobrinhos e padrinhos, pelo apoio e incentivo à continuação dos meus estudos, pela confiança e amor transmitidos.

Ao Fernando, pelo apoio incondicional e pela presença constante.

palavras-chave

Beta-lactamase, *Serratia fonticola*, resistência a antibióticos, carbapenemos, sobreexpressão, proteína recombinante, purificação.

resumo

A espécie *Serratia fonticola* inclui organismos que ocorrem naturalmente em águas. A maioria das estirpes expressa uma beta-lactamase cromossomal de espectro alargado de classe A (SFO-1), e uma beta-lactamase do tipo AmpC, específica da espécie. A estirpe *S. fonticola* UTAD54, isolada de águas de consumo não tratadas no Nordeste de Portugal, mostrou ser resistente a vários antibióticos beta-lactâmicos incluindo os carbapenemos. O genoma da estirpe UTAD54 codifica para uma metalo-enzima, Sfh-I, e uma nova β -lactamase de classe A, SFC-1. Estas enzimas estão ausentes noutras estirpes de *S. fonticola*. Para a compreensão deste complexo padrão de resistência iniciou-se a caracterização da beta-lactamase SFC-1. Depois da amplificação por PCR utilizando *primers* específicos, o gene *bla*_{SFC-1} foi clonado no vector de expressão pTrcHis e introduzido em células *E. coli* TOP10F'. A construção foi confirmada por análise de restrição e sequenciação de DNA. Foram preparados extractos brutos das células do clone de *E. coli* produtor da enzima recombinante. A actividade β -lactâmica foi detectada com nitrocefim em géis de SDS-PAGE. Apesar da produção de proteína recombinante ter sido confirmada, o sistema formado por pTrcHis e *E. coli* TOP10F' demonstrou não ser adequado à sobreexpressão da enzima SFC-1. Foram desenhados novos *primers* de PCR específicos contendo os locais de restrição apropriados à clonagem de *bla*_{SFC-1} no vector de expressão pET-26(+). A construção foi confirmada por análise de restrição e sequenciação de DNA e introduzida na estirpe hospedeira de expressão *E. coli* BL21(DE3). A utilização de extractos brutos em ensaios de actividade com aztreonam e géis de poliacrilamida com SDS confirmou a expressão da enzima SFC-1 na sua forma activa. Testes de susceptibilidade mostraram um elevado nível de resistência ao imipenem e meropenem com MICs de 32 μ g/ml. Foram estabelecidas as condições de cultura mais apropriadas à obtenção de uma elevada quantidade de enzima SFC-1 no seu estado nativo. A purificação da enzima foi efectuada por cromatografia de troca catiónica e de exclusão molecular. A pureza da preparação da SFC-1 foi visualizada por SDS-PAGE. A enzima SFC-1 pura tem aproximadamente 30,7 kDa.

keywords

Beta-lactamase, *Serratia fonticola*, antibiotic resistance, carbapenems, overexpression, recombinant protein, purification.

abstract

The species *Serratia fonticola*, includes organisms that occur in environmental waters. Most of strains express both a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase (SFO-1) and a species-specific AmpC beta-lactamase. *S. fonticola* UTAD54, isolated from untreated drinking waters in the Northeast of Portugal, showed to be resistant to carbapenems. The genome of strain UTAD54 encodes a metallo-enzyme, Sfh-I, and a novel class A β -lactamase, SFC-1. Those enzymes are absent from other *S. fonticola* strains. For a better understanding of this complex pattern of resistance we started the characterization of the enzyme SFC-1. After PCR amplification using specific primers, the *bla*_{SFC-1} gene was cloned in the expression vector pTrcHis and introduced in *E. coli* TOP10F' cells. The construction was confirmed by restriction analysis and DNA sequencing. Crude cell extracts of the *E. coli* clone expressing the recombinant enzyme were prepared. Beta-lactamase activity was detected with nitrocefin on SDS-PAGE gels. Although producing the recombinant protein, the system constituted by pTrcHis and *E. coli* TOP10F didn't prove to be useful to overexpress the SFC-1 enzyme. PCR specific primers were designed to contain the appropriate restriction sites for cloning the *bla*_{SFC-1} gene in the expression vector pET-26(+). The construction was transformed into the expression host *E. coli* BL21(DE3). Restriction analysis and DNA sequencing confirmed the construction. The use of crude cell extracts in activity assays with aztreonam and SDS-PAGE gels confirmed the expression of the SFC-1 enzyme. Susceptibility tests showed a high-level resistance to imipenem and meropenem with MICs of 32 μ g/ml for both drugs. The appropriate culture conditions to obtain a large quantity of the SFC-1 enzyme in the native state were established. Protein purification was made by ion-exchange chromatography and gel filtration. The purity of the SFC-1 preparation was visualized by SDS-PAGE. The purified SFC-1 has approximately 30,7 kDa.

ÍNDICE

Índice

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Agentes antimicrobianos e resistência bacteriana | 3 |
| 1.1.1. Antibióticos β -lactâmicos | 3 |
| 1.1.2. Mecanismo de acção | 4 |
| 1.2. Mecanismos de resistência | 5 |
| 1.2.1. Alteração de PBPs | 6 |
| 1.2.2. Redução da permeabilidade da membrana externa | 6 |
| 1.2.3. Mecanismo de efluxo..... | 7 |
| 1.3. β-Lactamases..... | 8 |
| 1.3.1. Classificação | 9 |
| 1.3.2. β -lactamases serínicas..... | 11 |
| 1.3.2.1. Estrutura..... | 11 |
| 1.3.2.2. Mecanismo catalítico | 13 |
| 1.3.2.3. Propriedades cinéticas | 15 |
| 1.4. Carbapenemases | 16 |
| 1.4.1. Metallo- β -lactamases | 17 |
| 1.4.2. Oxacilinas de classe D..... | 18 |
| 1.4.3. Carbapenemases de classe A | 19 |
| 1.4.3.1. Caracterização bioquímica..... | 20 |
| 1.4.3.2. Estrutura terciária | 22 |
| 1.5. O género <i>Serratia</i> | 24 |
| 1.6. Sistemas de expressão..... | 26 |
| 2. OBJECTIVOS..... | 29 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| 3.1. Estirpes bacterianas e plasmídeos..... | 35 |
| 3.2. Meios de cultura | 35 |
| 3.2.1. Aditivos para os meios de cultura..... | 36 |
| 3.3. Conservação de microrganismos | 37 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3.4. | Reagentes | 37 |
| 3.5. | Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos | 38 |
| 3.5.1. | Método de difusão em agar com tiras de antibióticos | 38 |
| 3.6. | Marcadores de peso molecular | 38 |
| 3.6.1. | Marcador de ácidos nucleicos..... | 38 |
| 3.6.2. | Marcador de proteínas | 39 |
| 3.7. | Preparação de DNA..... | 39 |
| 3.7.1. | Preparação de DNA total..... | 39 |
| 3.7.2. | Preparação de DNA plasmídico..... | 40 |
| 3.8. | Hidrólise de DNA por Endonucleases de Restrição..... | 41 |
| 3.9. | Amplificação de fragmentos de DNA por PCR | 41 |
| 3.10. | Electroforese..... | 42 |
| 3.10.1. | Electroforese de DNA em gel de agarose | 42 |
| 3.10.1.1. | Visualização de DNA | 43 |
| 3.10.2. | Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)..... | 43 |
| 3.10.2.1. | Preparação das amostras | 43 |
| 3.10.2.2. | Separação das proteínas | 43 |
| 3.10.2.3. | Deteção das proteínas | 44 |
| 3.11. | Determinação de sequências nucleotídicas a partir de DNA plasmídico – Sequenciação cíclica..... | 44 |
| 3.12. | Técnicas utilizadas na clonagem de fragmentos de DNA..... | 45 |
| 3.12.1. | Preparação de fragmentos de DNA | 46 |
| 3.12.2. | Ligação de fragmentos de DNA | 46 |
| 3.12.3. | Introdução de DNA em <i>E. coli</i> | 47 |
| 3.12.4. | Análise de recombinantes | 47 |
| 3.13. | Ensaio de expressão..... | 48 |
| 3.13.1. | Produção da proteína recombinante..... | 48 |
| 3.13.2. | Análise da actividade β -lactâmica | 49 |
| 3.14. | Produção da β-lactamase SFC-1 | 50 |
| 3.15. | Purificação da β-lactamase SFC-1 | 50 |
| 3.15.1. | Cromatografia | 50 |
| 3.15.2. | Determinação da quantidade de SFC-1 | 51 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 53 |
| 4.1. | Sobreexpressão de <i>bla</i>_{SFC-1} em <i>E. coli</i>..... | 55 |
| 4.1.1. | Caracterização dos sistemas de expressão | 55 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.1.2. | Clonagem do gene <i>bla</i> _{SFC-1} | 56 |
| 4.2. | Caracterização do fenótipo de resistência conferido pela enzima SFC-1..... | 58 |
| 4.3. | Detecção da actividade enzimática | 60 |
| 4.4. | Produção de SFC-1 em <i>E. coli</i> | 63 |
| 4.4.1. | Expressão em pTrcHis | 63 |
| 4.4.2. | Expressão em pET | 66 |
| 4.5. | Purificação da β -lactamase SFC-1 | 70 |
| 5. | CONCLUSÕES..... | 73 |
| 6. | PERSPECTIVAS FUTURAS | 77 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 81 |

Lista de abreviaturas

| | |
|-----------------|--|
| BCA | Ácido bicinconínico |
| Bicina | N,N-bis-(2-hidroxietil)glicina |
| DO | Densidade óptica |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| IPTG | Isopropiltioglicolato |
| LB | Luria-Bertani |
| PCR | Reacção em cadeia da polimerase |
| pI | Ponto isoelectrico |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetil sulfonil |
| Rpm | Rotações por minuto |
| SDS | Lauril sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Electroforese em gel de poliacrilamida com SDS |
| TEMED | n', n', n', n'-Tetrametil etienodiamina |
| Tris | 2-Amino 2-hidroximetil 1,3-propanodiol |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos . | 3 |
| Figura 2. Estrutura terciária da β -lactamase de classe A TEM. | 11 |
| Figura 3. Resíduos e rede de ligações de hidrogénio no centro activo da β -lactamase de classe A TEM. | 12 |
| Figura 4. Modelo geral da via catalítica das β -lactamases com centro activo serina. | 14 |
| Figura 5. Modificação da posição da cadeia 3- β nas carbapenemases de classe A. | 23 |
| Figura 6. Representação esquemática do mapa de restrição do plasmídeo recombinante pET-26(+) contendo o gene <i>bla</i> _{SFC-1} . | 58 |
| Figura 7. Produção da SFC-1 nas diferentes temperaturas testadas, para os dois sistemas de expressão. | 64 |
| Figura 8. Actividade específica dos extractos brutos das culturas de <i>E. coli</i> TOP10F'. | 65 |
| Figura 9. SDS-PAGE dos extractos da cultura de <i>E. coli</i> BL21(DE3)(pMF13) crescida a 25°C. | 67 |
| Figura 10. Perfil cromatográfico (a 280 nm) de um extracto da cultura de <i>E. coli</i> BL21(DE3) aplicado a uma coluna de troca catiónica SP Sepharose™. | 70 |
| Figura 11. Perfil cromatográfico (a 280nm) da fracção activa aplicada a uma coluna de exclusão molecular Superdex™ 75. | 71 |
| Figura 12. SDS-PAGE da SFC-1 purificada a partir de <i>E. coli</i> BL21(DE3)(pMF13). | 71 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Classificação e propriedades das β -lactamases. | 10 |
| Tabela 2. Carbapenemases: classificação e exemplos de enzimas descritas. | 17 |
| Tabela 3. Características bioquímicas das carbapenemases de classe A. | 21 |
| Tabela 4. Parâmetros da hidrólise das carbapenemases de classe A. | 22 |
| Tabela 5. Estirpes bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho. | 35 |
| Tabela 6. Valores das MICs (<i>Minimal Inhibitory Concentrations</i>) determinados para as estirpes de <i>S. fonticola</i> e de <i>E. coli</i> . | 59 |
| Tabela 7. Resumo do procedimento de purificação da β -lactamase SFC-1. | 72 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Agentes antimicrobianos e resistência bacteriana

Os antibióticos, compostos que são literalmente “contra a vida”, são tipicamente drogas antibacterianas que interferem com alguma estrutura ou processo que é essencial ao crescimento ou sobrevivência bacteriana sem afectar o hospedeiro eucariota que apresenta a infecção bacteriana. Os antibióticos podem matar as bactérias (bacteriocidas) ou por vezes apenas anular o seu crescimento (bacteriostático) (Walsh, 2000). São conhecidos três alvos das principais classes de compostos antibacterianos: biossíntese da parede celular bacteriana (ex. antibióticos β -lactâmicos e vancomicina), síntese proteica bacteriana (ex. aminoglicosídeos, tetraciclina) e replicação e reparação do DNA bacteriano (ex. fluoroquinolonas) (Köhler *et al.*, 1999; Neu, 1992; Walsh, 2000).

1.1.1. Antibióticos β -lactâmicos

Os agentes antimicrobianos da classe β -lactâmica são considerados os mais seguros e eficazes. Estes compostos são ainda caracterizados pela ausência de efeitos secundários em organismos superiores. Devido a estas características, os antibióticos β -lactâmicos são os agentes antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções bacterianas (Bush, 2002; Therrien e Levesque, 2000; Williams, 1999).

Os antibióticos β -lactâmicos são uma classe de agentes antimicrobianos que pode ser dividida em quatro grupos principais, de acordo com a sua estrutura: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos (Demain e Elander, 1999) (Fig.1).

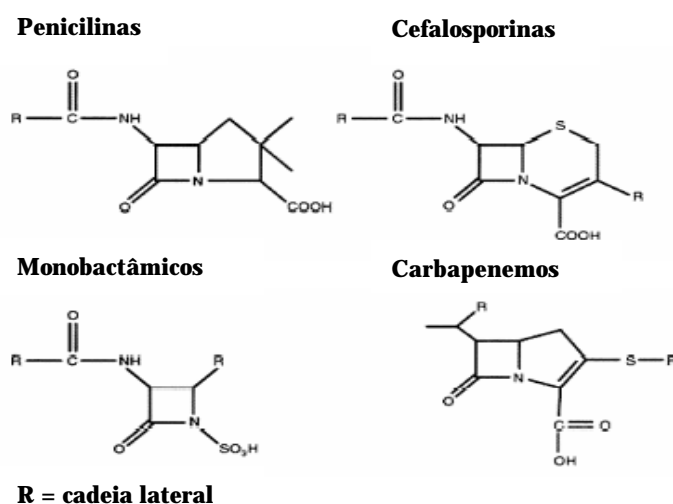


Figura 1. Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos. Adaptado de Williams, 1999.

Esta família de antibióticos apresenta, como estrutura comum, um anel β -lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de azoto, com radicais substituintes; os grupos diferem entre si pela presença de anéis adicionais. Assim, o anel β -lactâmico encontra-se fundido com um anel de tiazolidina nas penicilinas e com um anel de di-hidrotiazina nas cefalosporinas. Os monobactâmicos não possuem qualquer anel fundido com o anel β -lactâmico. Os carbapenemos possuem o anel β -lactâmico fundido com um anel semelhante ao das penicilinas mas insaturado, e possuindo um átomo de carbono a substituir o de enxofre. Os vários antibióticos de cada grupo distinguem-se pela natureza de uma ou duas das suas cadeias laterais (Demain e Elander, 1999). Mais de 40 moléculas β -lactâmicas estruturalmente diferentes estão disponíveis em 73 formulações, sendo a maioria delas correntemente prescritas para uso médico (Therrien e Levesque, 2000). O efeito antibacteriano de todos os antibióticos beta-lactâmicos depende da sua capacidade de se difundirem através da membrana celular, da afinidade do antibiótico para as proteínas alvo e da estabilidade deste à degradação bacteriana (Dever e Dermody, 1991).

1.1.2. Mecanismo de acção

O mecanismo de acção dos antibióticos β -lactâmicos compreende a inactivação da síntese da parede celular bacteriana. Um dos principais componentes da parede celular é o peptidoglicano, uma rede de cadeias peptídicas e glicano que podem estar covalentemente interligadas. Este é responsável pela manutenção da morfologia bacteriana e resistência à lise osmótica (Massova e Mobashery, 1998; Walsh, 2000). A transpeptidação é o passo final na síntese da parede celular que consiste na interligação (“*cross-linking*”) das cadeias de peptidoglicano, conferindo rigidez à parede celular (Ghuysen, 1997; Bush e Mobashery, 1998). Esta reacção é catalisada por um conjunto de enzimas serínicas designadas proteínas de ligação à penicilina (PBPs – *Penicillin Binding Proteins*). Tiper e Strominger (1965) sugeriram que o núcleo dos antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina, mimetiza a porção terminal acil D-Ala-D-Ala da estrutura do peptidoglicano. Esta porção do peptidoglicano liga-se à PBP durante o passo de interligação. Num passo inicial, um complexo acil-enzima é formado pela reacção do grupo hidroxilo da serina do centro activo com o terminal acil D-Ala-D-Ala, seguido por uma segunda reacção envolvendo outra cadeia de peptidoglicano para o estabelecimento da interligação. No entanto, os antibióticos β -lactâmicos ligam-se a PBPs, o que provoca a formação de um complexo acil-enzima

com a PBP por acilação da serina do seu centro activo, modificando o centro activo da enzima. Nesta situação, a segunda reacção não ocorre, resultando na inibição irreversível do processo catalítico das PBPs (Kotra e Mobashery, 1999). Isto provoca uma biossíntese incompleta da parede celular bacteriana, um dano na estrutura que conduz à morte celular bacteriana (Bush e Mobashery, 1998; Kotra e Mobashery, 1999). A elevada especificidade destes agentes antibacterianos e a ausência de efeitos secundários, é assim explicada, uma vez que moléculas similares aos precursores do peptidoglicano não existem em células eucariotas (Frère, 1995).

1.2. Mecanismos de resistência

A resistência antimicrobiana confere uma vantagem para a sobrevivência de um organismo quando o antibiótico está presente no ambiente. Na presença de um antibiótico, as estirpes resistentes sobrevivem e as células susceptíveis são inibidas ou morrem. Assim, é importante para um organismo ser resistente intrínseco (natural) ou adquirir resistência depois da introdução de drogas no ambiente da célula bacteriana (Pitout *et al.*, 1997). A resistência aos antibióticos pode resultar de mutações espontâneas, que conduzem à activação ou modificação de determinantes cromossomais, ou da aquisição de genes de resistência localizados em elementos genéticos móveis: transposões, plasmídeos ou integrões (Köhler *et al.*, 1999).

Os antibióticos β -lactâmicos têm sido usados para tratamento clínico há mais de 50 anos. Desde a sua introdução, a eficácia destes antibióticos tem sido desafiada pelo aparecimento de estirpes patogénicas resistentes (Matagne *et al.*, 1998). Além de usados em terapia humana, os compostos β -lactâmicos têm sido utilizados de modo inapropriado e abusivo como promotores de crescimento na criação de animais e agentes terapêuticos na agricultura, com um impacto económico importante na indústria (Witte, 1998). Este uso extensivo de antibióticos bacterianos tem conduzido a uma grande disseminação de estirpes resistentes (Witte, 1998).

As bactérias têm desenvolvido mecanismos para escapar à acção de todos os antibióticos e os β -lactâmicos não são excepção (Williams, 1999). A resistência a estes agentes é comum a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e é mediada por quatro mecanismos: alteração no local alvo (i.e. PBPs), redução da entrada do antibiótico por diminuição da permeabilidade e/ou por mecanismos de efluxo e inactivação do antibiótico por enzimas hidrolíticas (Neu, 1992; Davies, 1994; Poole, 2004).

1.2.1. Alteração de PBPs

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos devido a modificação das PBPs, ocorre quer por mutações nos genes cromossomais que codificam para as PBPs, quer através da aquisição de genes suplementares que codificam para novas PBPs com reduzida afinidade para os antibióticos (Georgopapadakou, 1993). Este mecanismo de resistência é importante em cocos Gram-positivos tais como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, mas é observado menos frequentemente em bactérias Gram-negativas (Pitout *et al.*, 1997).

Em *S. aureus* a resistência à penicilina e meticilina ocorre devido à produção de uma PBP adicional, designada PBP-2', codificada pelo gene *mecA* e com reduzida afinidade para a maioria dos antibióticos β -lactâmicos (de Lancastre *et al.*, 1994). A resistência a β -lactâmicos em *S. pneumoniae* é devida à produção de várias PBPs alteradas, com reduzida afinidade para esta classe de antibióticos. Estas PBPs são resultado da aquisição e incorporação de pedaços de DNA exógeno conduzindo à formação de genes híbridos de PBPs, designados por genes mosaico (Spratt, 1994).

Em bactérias Gram-negativas, têm sido descritas mutações em genes de PBPs para estirpes resistentes de *Haemophilus influenzae* e *Neisseria spp.* (Dabernat *et al.*, 2002; Antignac *et al.*, 2003). Resistência a carbapenemos devido a alterações em PBPs tem sido observada em *Acinetobacter baumannii* (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003) e *Proteus mirabilis* (Neuwirth *et al.*, 1995). A produção de PBPs alteradas com reduzida afinidade para β -lactâmicos também é observada em *Pseudomonas aeruginosa* (Gotoh *et al.*, 1990) e *Helicobacter pylori* (Gerrits *et al.*, 2002).

1.2.2. Redução da permeabilidade da membrana externa

Nas bactérias Gram-negativas a membrana externa funciona como uma barreira para os agentes antimicrobianos e protege as PBPs do ambiente externo. Os nutrientes e os antibióticos têm de atravessar a membrana para atingirem o interior da célula. Isto acontece por difusão passiva através de canais aquosos formados por proteínas designadas porinas (Nikaido, 1989; Nikaido, 2001). A reduzida permeabilidade da membrana externa aos β -lactâmicos, como resultado da perda ou alterações na estrutura destas porinas, pode promover resistência a estes agentes. Esta forma de resistência normalmente conduz a resistência múltipla, uma vez que vários antibióticos partilham, frequentemente, a mesma porina. Alternativamente,

pode ocorrer resistência específica quando apenas um antibiótico utiliza uma porina (Pitout *et al.*, 1997).

A resistência ao imipenemo em *P. aeruginosa* é um exemplo de resistência específica que surge da perda de uma porina específica para carbapenemos, designada OprD. Mutações que conduzem à perda de produção da proteína OprD, resultam na resistência específica ao imipenemo associada a uma reduzida susceptibilidade ao meropenemo (Livermore, 2001; Livermore, 2002). Resistência similar aos carbapenemos tem sido associada à porina OmpK36 em *Klebsiella pneumoniae* (Hernandez-Alles *et al.*, 1999). A alteração na permeabilidade da célula pode também contribuir para a resistência ao imipenemo em *Enterobacter spp.* e *Serratia spp.*, quando combinada com a produção de beta-lactamases cromossomais (Sanders, 1992).

Este mecanismo de resistência está normalmente associado com o aumento da expressão de bombas de efluxo, aumentando assim a resistência do microrganismo (Nikaido, 1994).

1.2.3. Mecanismo de efluxo

A reduzida permeabilidade da membrana externa das bactérias Gram-negativas contribui bastante para a resistência intrínseca (natural) destes microrganismos a uma vasta gama de antibióticos. No entanto, por si só, esta barreira não é suficiente para tornar as bactérias resistentes a estes agentes. As bombas de efluxo de antibióticos constituem outro dos mecanismos envolvidos nesta resistência intrínseca (Köhler *et al.*, 1999; Nikaido, 2001), presente em bactérias Gram-negativas (Poole, 2001) e Gram-positivas (Markham e Neyfakh, 2001).

As bombas de efluxo são constituídas por uma proteína na membrana citoplasmática que funciona como transportador de antibióticos (e outros substratos tóxicos) para o exterior da célula (Nikaido, 1994). Nas bactérias Gram-negativas os sistemas de efluxo também envolvem porinas da membrana externa que estão ligadas ao transportador da membrana interna por uma proteína que se encontra no espaço periplásmico, entre as duas estruturas membranares (Nikaido, 2001). Os sistemas de efluxo dividem-se em cinco classes, sendo, no entanto, mais relevante para a resistência a antibióticos β -lactâmicos a família de transportadores RND (*resistance-nodulation-division*) (Poole, 2001; Nikaido, 2001).

As bombas podem ser específicas para um determinado composto ou podem transportar uma gama de compostos diferentes, incluindo antibióticos de diferentes

classes, corantes e detergentes. A bomba de efluxo AcrB de *Escherichia coli*, por exemplo, excreta tetraciclina, cloranfenicol, β -lactâmicos, corantes e detergentes (Nikaido, 2001).

As bombas de efluxo podem actuar em conjunto com outro mecanismo de resistência, para não só aumentar o nível mas também alargar o espectro de resistência (Van Bambeke *et al.*, 2003). Por exemplo, em *P. aeruginosa*, a elevada resistência intrínseca às penicilinas resulta da interacção entre a barreira da membrana externa, um sistema de efluxo activo MexAB-OprM e uma β -lactamase AmpC (Okamoto *et al.*, 2001). Em *E. coli* a expressão da β -lactamase AmpC confere resistência a cefalosporinas de primeira e segunda geração e a expressão da bomba AcrB provoca resistência à maioria das penicilinas (Mazzariol *et al.*, 2000). A resistência intrínseca de *Listeria monocytogenes* às cefalosporinas parece dever-se à expressão da bomba MdrL, além da expressão de PBPs com reduzida afinidade para esta classe de antibióticos (Mata *et al.*, 2000).

1.3. β -Lactamases

O mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos mais comum, particularmente entre bactérias Gram-negativas, é a produção de β -lactamases. As β -lactamases são enzimas hidrolíticas que clivam a ligação amida do anel β -lactâmico, tornando estes antibióticos em compostos microbiologicamente inactivos (Poole, 2004; Kotra e Mobashery, 1998).

As β -lactamases são estruturalmente relacionadas com as PBPs e podem ter evoluído a partir destas enzimas envolvidas na biossíntese da parede celular (Massova e Mobashery, 1998). A primeira β -lactamase foi identificada em *E. coli* por Abraham e Chain (1940) antes da utilização clínica do primeiro antibiótico β -lactâmico, a penicilina. Desde então estas enzimas têm sido descritas em bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e em micobactérias (Majiduddin *et al.*, 2002; Livermore, 1995), onde estão codificadas no cromossoma ou em plasmídeos, e frequentemente associadas a elementos genéticos móveis, nomeadamente transposões e integrões (Poole, 2004). Actualmente pelo menos 340 β -lactamases, com sequências únicas de aminoácidos, foram já descritas (Bush, 2001).

As β -lactamases produzidas por organismos Gram-positivos são secretadas para o meio extracelular; aquelas produzidas por organismos Gram-negativos são, normalmente, concentradas no espaço periplásmico, não sendo secretadas (Dever e

Dermody, 1991). Em bactérias Gram-negativas, as β -lactamases indutíveis são codificadas apenas por genes cromossomais, enquanto as β -lactamases expressas constitutivamente podem ser codificadas por genes localizados no cromossoma ou em plasmídeos (Pitout *et al.*, 1997).

1.3.1. Classificação

Devido à diversidade das características enzimáticas das muitas β -lactamases identificadas até ao momento, várias tentativas têm sido feitas para categorizar e classificar este grupo de enzimas. Estas classificações são baseadas em características funcionais e bioquímicas ou na estrutura molecular da enzima. O primeiro esquema de classificação funcional foi proposto por Sawai e colaboradores, em 1968, distinguindo apenas cefalosporinases e penicilinas. Em 1973, Richmond e Sykes propuseram um novo esquema que incluía todas as β -lactamases das bactérias Gram-negativas já descritas e classificava estas enzimas em cinco grupos, de acordo com a sua especificidade para os substratos e para os inibidores. Esta classificação foi modificada por Sykes e Matthew (1976), incluindo a técnica de focagem isoeléctrica para distinguir β -lactamases plasmídicas.

As classificações com base na estrutura molecular foram inicialmente propostas por Ambler (1980), quando se conheciam apenas quatro sequências de aminoácidos de β -lactamases. Este esquema de classificação distinguia uma classe de enzimas serínicas, designada classe A, em oposição às metalo- β -lactamases de classe B, e foi completado com a inclusão das cefalosporinases de classe C (Jaurin e Grudstrom, 1981) e das oxacilinas de classe D (Ouellette *et al.*, 1987; Huovinem *et al.*, 1988).

Com o aparecimento de novas β -lactamases e uma maior facilidade de obtenção de sequências nucleotídicas, foi possível desenvolver uma classificação que relaciona a especificidade para o substrato e para inibidores com a estrutura molecular (Bush, 1989). Esta classificação foi posteriormente actualizada por Bush, Jacoby e Medeiros (1995) e é actualmente o esquema de classificação de β -lactamases mais utilizado. Neste esquema as enzimas são inicialmente separadas de acordo com a sua inibição pelo agente quelante de metais, EDTA, e posteriormente de acordo com o perfil de substratos hidrolisados. Assim, as β -lactamases são classificadas em quatro grupos principais. O grupo funcional 1 (classe molecular C) inclui enzimas que não são inibidas pelo EDTA e hidrolisam preferencialmente a cefaloridina, sendo designadas

por cefalosporinas. O grupo funcional 2 (classes A e D de Ambler) engloba enzimas que não são inibidas pelo EDTA, mas sim pelos inibidores de β -lactamases, nomeadamente o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam, e que hidrolisam preferencialmente a benzilpenicilina, denominadas por penicilinas. Inclui também β -lactamases de espectro alargado. O grupo 3 (classe molecular B) inclui β -lactamases que são inibidas pelo EDTA, mas não por inibidores de β -lactamases, e que hidrolisam carbapenemos, sendo por isso designadas por carbapenemases. No grupo 4 são incluídas enzimas não inibidas pelo EDTA, mas que não se adequam a nenhuma das categorias anteriores. Na tabela seguinte são apresentados os sistemas de classificação de β -lactamases mais importantes e enzimas representativas de cada grupo.

Tabela 1. Classificação e propriedades das β -lactamases (adaptado de Bush *et al.*, 1995; Poole, 2004).

| Grupo funcional (Bush <i>et al.</i> , 1995) | Classe molecular | Perfil de substratos | Inibição com EDTA AC ^a | | Enzimas representativas |
|--|------------------|---|--------------------------------------|---|--|
| 1 | C | Cefalosporinas, penicilinas, cefamicinas e monobactâmicos | - | - | Enzimas tipo AmpC, CMY-2 a -13, FOX-1 a -6, ACT-1, LAT-1, MIR-1, DHA-1 e -2, CFE-1 |
| 2a | A | Penicilinas | + | - | Penicilinas de bactérias Gram-positivas |
| 2b | A | Penicilinas, cefalosporinas | + | - | TEM-1, TEM-2, SHV-1 |
| 2be | A | Penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos | + | - | Numerosas variantes TEM e SHV, CTX-M-1 a -28, PER-1 e -2, VEB-1, GES-1, IBC-1 |
| 2br | A | Penicilinas | - | - | TEM-30 a -41, TEM-44 a -45, TEM-51 e TEM-54 |
| 2c | A | Penicilinas, carbenicilinas | + | - | PSE-1, PSE-3, PSE-4 |
| 2d | D | Penicilinas, cloxacilinas | ? | - | Numerosas variantes OXA |
| 2e | A | Cefalosporinas | + | - | Cefalosporinase indutível de <i>Proteus vulgaris</i> |
| 2f | A | Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos | + | - | NMC-A, Sme-1 e -2, IMI-1, KPC-1 a -3 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|--|
| 3 | B | Maioria dos beta-lactâmicos, incluindo carbapenemos | - | + | L1, CphA, ImiS, ImiH, IMP-1 a -13, VIM-1 a -7, SPM-1 |
| 4 | - | Penicilinas | - | ? | Penicilinase de <i>Pseudomonas cepacia</i> |

^a Ácido clavulânico.

1.3.2. β -lactamases serínicas

1.3.2.1. Estrutura

O estudo de estruturas terciárias de várias β -lactamases das classes A e C, demonstrou similaridades impressionantes com as proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Estas proteínas são formadas por dois domínios estruturais: um constituído apenas por hélices α e outro, α/β , constituído por hélices α e folhas β (Fig. 2) com o centro activo localizado na junção entre os dois domínios (Frère, 1995).

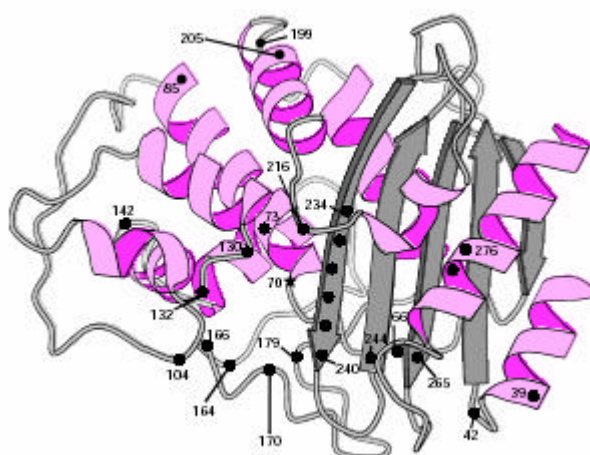


Figura 2. Estrutura terciária da β -lactamase de classe A TEM. A estrela assinala o carbono- α da serina do centro activo (Matagne *et al.*, 1998).

Os estudos de cristalografia confirmaram a presença, em todas estas proteínas, de três elementos estruturais envolvidos na formação do centro activo e que podem também ser detectados por alinhamento de sequências (Philippon *et al.*, 1998). Estes contêm cadeias laterais idênticas e, aparentemente, fornecem grupos essenciais para a catálise.

O primeiro elemento, SXXK (X representa qualquer aminoácido), posiciona a serina do centro activo, Ser-70 de acordo com a numeração de Ambler *et al.* (1991) nas β -lactamases de classe A, (Ser-64 nas de classe C), no terminal amínico de um conjunto de péptidos enrolados, a hélice α_2 (Medeiros, 1997), seguida por um resíduo

de lisina cuja cadeia lateral também aponta para o centro activo, onde contribui para um conjunto de ligações de hidrogénio (Fig. 3) com os outros resíduos conservados (Frère, 1995).

O segundo elemento, situado num *loop* entre as hélices α_4 e α_5 (domínio α), contém SXN ou YXN. O primeiro resíduo é hidroxilado, a serina (Ser-130) nas β -lactamases de classe A e tirosina nas de classe C e D, e nas PBPs. O segundo resíduo é variável nas três classes mas o último é sempre uma asparagina. As cadeias laterais do primeiro e terceiro resíduo apontam para o centro activo, formando uma parede da cavidade, enquanto o segundo resíduo se situa no centro da proteína (Matagne *et al.*, 1998; Frère 1995).

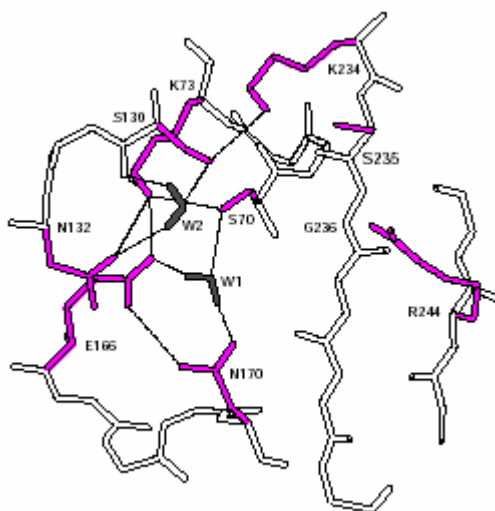


Figura3. Resíduos e rede de ligações de hidrogénio (a tracejado), no centro activo da β -lactamase de classe A TEM (Matagne *et al.*, 1998).

O terceiro elemento, situado na cadeia mais interior da cadeia β (domínio α/β), forma a parede oposta do centro activo e é formado pela tríada lisina/histidina-treonina/ serina-glicina (Matagne *et al.*, 1998). A cadeia lateral do primeiro resíduo aponta para o centro activo, formando uma ligação de hidrogénio com o primeiro resíduo do segundo elemento, e a conservação do resíduo glicina deve-se ao facto de esta não possuir cadeias laterais, que poderiam prejudicar a aproximação dos substratos (Philippon *et al.*, 1998; Matagne *et al.*, 1998). Os elementos estruturais do centro activo são frequentemente referidos como motivos SXXK, SDN e KTG, respectivamente.

Nas β -lactamases de classe A, um quarto elemento está situado num segundo *loop*, o O *loop*. Num conjunto denso de ligações de hidrogénio no centro activo, dois dos

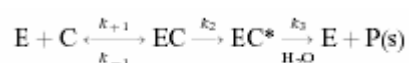
seus resíduos, Glu-166 e Asn-170, são essenciais para posicionar a molécula de água conservada W1 nas proximidades da serina do centro activo (Lamotte-Brasseur, *et al.*, 1991). As β -lactamases de classe A possuem ainda uma arginina na posição 244 que liga outra molécula de água em posição para reagir com o anel β -lactâmico do clavulanato e dos inibidores sulfona (Medeiros, 1997).

A estrutura fechada da cavidade do centro activo das β -lactamases de classe A e o posicionamento preciso da molécula de água próxima da ligação acil-serina do intermediário da enzima, sugere que estas enzimas são produzidas para uma rápida desacilação (hidrólise) dos β -lactâmicos (Medeiros, 1997).

Substituições de um ou quatro aminoácidos nas posições 104 a 240 dos genes estruturais, originam cavidades do centro activo mais espaçosas, fazendo com que β -lactâmicos de terceira geração (moléculas com tamanho superior) se liguem à Ser-70. As β -lactamases TEM e SHV têm pontes dissulfeto e pontes salinas que estabilizam as proteínas e podem permitir a ocorrência de maior número de substituições sem prejuízo da actividade enzimática (Knox, 1995; Medeiros, 1997).

1.3.2.2. Mecanismo catalítico

A reacção catalisada pelas β -lactamases é essencialmente a mesma, independentemente da enzima e dos substratos envolvidos. Nas β -lactamases com centro activo serina o mecanismo catalítico envolve a formação de um complexo acil-enzima, semelhante ao observado para as PBPs, seguindo um modelo de três etapas descrito pela equação:



em que E representa a enzima, C o antibiótico, EC um complexo Henri-Michaelis não covalente, EC* um complexo acil-enzima covalente, e P(s) os produtos inactivos resultantes da degradação dos antibióticos (Frère *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 1980). Este modelo geral (Fig. 4) envolve a ligação da β -lactamase ao substrato, formando um complexo enzima-substrato não covalente, reversível. De seguida, ocorre a formação de um complexo acil-enzima, no qual o grupo hidroxilo da serina do centro activo é esterificado pelo carbono carbonilo do anel β -lactâmico do antibiótico. A desacilação deste complexo covalente liberta o substrato hidrolisado, inactivo, e regenera a enzima (Frère *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 1980).

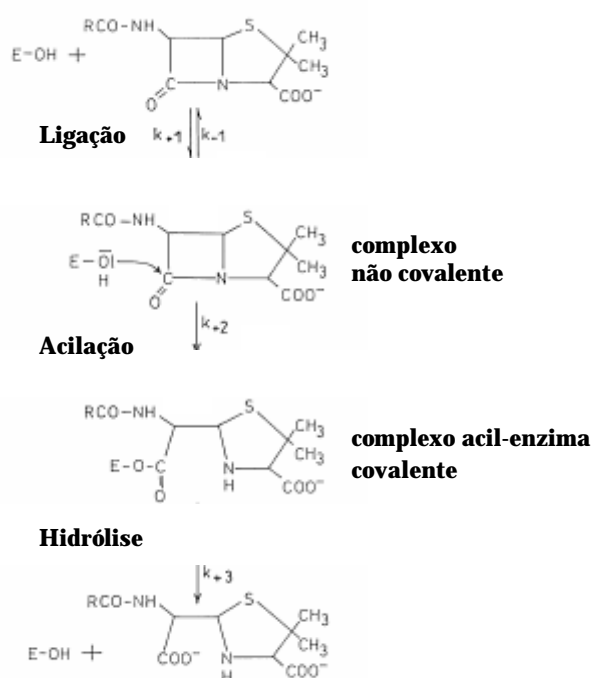


Figura 4. Modelo geral da via catalítica das β -lactamases com centro activo serina. Adaptado de Matagne *et al.*, 1998.

O mecanismo catalítico das β -lactamases de classe A envolve o ataque nucleofílico do grupo carbonilo do anel β -lactâmico pela Ser-70. Apesar do mecanismo exacto de acilação e desacilação permanecer ainda por esclarecer, dados obtidos por cristalografia e mutagénese dirigida indicam que o Glu-166 actua como base geral, aumentando a nucleofilicidade do hidroxilo da Ser-70, através de uma molécula de água conservada (Lamotte-Brasseur *et al.*, 1991; Knox e Moews, 1991). Após ligação do substrato ao centro activo, o grupo hidroxilo da Ser-70 reage com o carbono carbonilo da ligação amida do anel β -lactâmico. Forma-se então um complexo activado de geometria tetraédrica em torno desse carbono. A quebra do complexo envolve a transferência de um hidrogénio do Glu-166 para o nitrogénio do anel β -lactâmico, através da sub-rede de ligações de hidrogénio (Fig. 3) em que o grupo hidroxilo da Ser-130 actua como último dador de protões (Lamotte-Brasseur *et al.*, 1991; Lamotte-Brasseur *et al.*, 1992). Este processo origina um primeiro produto com um novo terminal amina, enquanto a restante parte do substrato permanece numa ligação éster com a Ser-70. A hidrólise da acil-enzima ocorre de acordo com um mecanismo simétrico, proposto por Lamotte-Brasseur e co-autores (1991) em que o Glu-166 activa

uma molécula de água para reagir com o carbono carbonilo da acil-enzima e assegura a devolução do protão à Ser-70, conduzindo à regeneração da enzima livre.

Uma segunda hipótese, avançada por Strynadka e colaboradores (1992), sugere um mecanismo assimétrico, com a participação de duas bases gerais diferentes, Lys-73 e Glu-166, na acilação e desacilação, respectivamente. No entanto, um estudo das propriedades catalíticas de um mutante Glu-166-Asn da β -lactamase TEM-1 demonstrou uma diminuição clara da eficiência da acilação (Guillaume *et al.*, 1997). Estes dados cinéticos não estão de acordo com a hipótese de um mecanismo assimétrico (Strynadka *et al.*, 1992), e corroboram a hipótese proposta por Lamotte-Brasseur e co-autores (1991) na qual o Glu-166 actua como base geral na formação e hidrólise do intermediário acil-enzima, através de uma molécula de água conservada.

1.3.2.3. Propriedades cinéticas

A cinética da hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos pelas β -lactamases segue uma curva hiperbólica descrita pela equação de Michaelis-Menten (Fisher *et al.*, 1980; Bush e Sykes, 1986).

Como referido anteriormente, as enzimas de classe A são frequentemente referidas como ‘penicilinasas’, enquanto as de classe C são ‘cefalosporinasas’ e as de classe D são ‘oxacilinasas’, uma distinção baseada originalmente na actividade hidrolítica relativa (V) em relação aos vários compostos (Bush, 1989). Actualmente esta distinção tem pouco significado, pois a grande quantidade de dados disponíveis indica que os parâmetros cinéticos podem variar muito dentro da mesma classe, mas também podem ser semelhantes entre enzimas que pertencem a classes diferentes (Matagne *et al.*, 1999).

A especificidade das β -lactamases depende das taxas de acilação e desacilação. Nestas enzimas a acilação e a hidrólise da acetil-enzima são geralmente rápidas, resultando em elevadas taxas de renovação (k_{cat}) e de eficiência catalítica (k_{cat}/K_m). A eficiência catalítica é independente da taxa de desacilação e corresponde à reacção de segunda ordem para a reacção de acilação (Frère, 1995).

Nas β -lactamases com serina no centro activo, uma hidrólise lenta de um substrato pode dever-se a uma falha no reconhecimento da molécula ou a uma elevada estabilidade da acil-enzima. A primeira situação prevalece com algumas enzimas de classe A quando estas actuam sobre a cefoxitina ou cefalosporinas de terceira geração, enquanto a segunda ocorre com enzimas de classe C e os mesmos compostos. Com a

excepção da enzima PC1 de *S. aureus*, as enzimas de classe A não interagem significativamente com substratos cujo valor k_{cat}/K_m é baixo, enquanto as proteínas de classe C sofrem acilação (valor k_{cat}/K_m elevado) mas permanecem imobilizadas como acil-enzimas (valor k_{cat} baixo) (Frére, 1995).

As β -lactamases de classe A apresentam uma grande variabilidade de parâmetros cinéticos para um determinado composto β -lactâmico. A eficiência catalítica destas enzimas é dada por ambos os valores, k_{cat}/K_m e k_{cat} , uma vez que elevados valores de k_{cat}/K_m podem ser devidos a valores muito baixos de k_{cat} e K_m (Matagne *et al.*, 1999).

Com os seus melhores substratos, algumas enzimas de classe A apresentam valores muito elevados de k_{cat}/K_m (próximo do limite de difusão, $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e de k_{cat} (superior a 7000 s^{-1}) aproximando-se da “perfeição catalítica” (Christensen *et al.*, 1990).

1.4. Carbapenemases

O tratamento de doenças infecciosas pelas penicilinas e cefalosporinas é continuamente desafiado pela emergência e disseminação de numerosos mutantes TEM e SHV com perfis de substrato alargado (Bush *et al.*, 1995). Em infecções bacterianas resistentes a penicilinas e cefalosporinas, o imipenemo e outros carbapenemos são considerados os antibióticos de último recurso (Bush, 1998; Bush e Rasmussen, 1997). A eficácia antibacteriana dos carbapenemos deve-se a vários factores: são resistentes a hidrólise pela maioria das β -lactamases descritas, incluindo as de espectro alargado; as carbenicilinasas, oxacilinasas e cefalosporinasas cromossomais que hidrolisam o imipenemo fazem-no muito lentamente; e, por último, os carbapenemos apresentam uma afinidade muito grande para as PBPs (Bush e Mobashery, 1998; Yang *et al.*, 1995).

Várias enzimas de ocorrência natural capazes de hidrolisar os carbapenemos têm sido caracterizadas desde 1980. Estas são geralmente expressas em várias espécies com pouca relevância a nível clínico (Livermore e Woodford, 2000).

O número de β -lactamases que hidrolisam os carbapenemos, ‘carbapenemases’, tem vindo a aumentar nos últimos anos (Bradford, 2001). De acordo com Nordmann e Poirel (2002), as carbapenemases podem ser definidas como β -lactamases que hidrolisam significativamente pelo menos imipenemo e/ou meropenemo. Adicionalmente, algumas destas β -lactamases apresentam a capacidade de hidrolisar

outros antibióticos, nomeadamente penicilinas e cefalosporinas (Thomson e Moland, 2000). Este grupo de enzimas é constituído por uma mistura heterogénea de β -lactamases pertencentes às classes moleculares A (penicilinases), B (metalo-enzimas) e D (oxacilinases) (tabela 2).

Tabela 2. Carbapenemases (adaptado de Thomson e Moland, 2000).

| Tipo de β -lactamase | Enzimas descritas |
|--|--|
| β-lactamases serínicas | |
| Classe A (grupo funcional 2f) | Sme-1 e 2, NMC-A, IMF-1, KPC-1 e 2 |
| Classe C (grupo funcional 1) | AmpC (actividade reduzida quando produzida a níveis elevados) |
| Classe D (grupo funcional 2d) | OXA-23 a 27, OXA-40 |
| Metalo-β-lactamases | |
| Classe B (grupo funcional 3) | Enzimas cromossomais: CcrA, CphA, ImiS, ImiH, L1, FEZ-1, SFH-I Enzimas plasmídicas: IMP, VIM, MET-1 |
| β-lactamase não classificada | AVS-1 |

Algumas β -lactamases de classe C e D apresentam uma capacidade reduzida de hidrolisar os carbapenemos e geralmente requerem a presença de um mecanismo de resistência adicional, como permeabilidade reduzida da membrana externa para conferirem resistência aos carbapenemos (Rasmussen e Bush, 1997; Livermore, 1997).

1.4.1. Metalo- β -lactamases

As metalo- β -lactamases (classe molecular B) incluem um número reduzido de enzimas, quando comparado com o grupo das β -lactamases serínicas. A primeira destas enzimas foi isolada em *Bacillus cereus* (BcII) em 1966 (Sabath e Abraham, 1966) e, durante duas décadas, foi o único exemplar tendo sido considerada como uma curiosidade bioquímica. Actualmente, estas β -lactamases têm sido descritas em diversas espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tais como *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis*, *Chryseobacterium* spp., *Legionella gormanii*, *Stenotrophomonas* spp., e várias espécies diferentes de *Aeromonas*. Nestes géneros, as metalo-enzimas ocorrem naturalmente e são codificadas por genes cromossomais (Bush, 1998; Rasmussen e Bush, 1997).

A maioria das carbapenemases pertence ao grupo das metalo-enzimas. Estas enzimas são únicas entre as β -lactamases por possuírem zinco no centro activo e são a única família de β -lactamases em que a actividade de carbapenemase é prevalente (Livermore e Woodford, 2000). Além disso, não apresentam resistência aos inibidores

de β -lactamases disponíveis (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) mas são inibidas por agentes quelantes de metais, como o EDTA (Bush *et al.*, 1995; Galleni *et al.*, 2001). Muitas das enzimas desta classe possuem a capacidade de hidrolisar virtualmente todas as classes de substratos β -lactâmicos, incluindo os carbapenemos. Apesar da falta de actividade contra os monobactâmicos, a presença de β -lactamases adicionais tende a comprometer o uso destes agentes em estirpes produtoras de metalo- β -lactamases (Rasmussen e Bush, 1997).

As metalo- β -lactamases adquiridas são geralmente de dois tipos, IMP e VIM, são codificadas por plasmídeos ou pelo cromossoma, e estão normalmente associadas a integrões que transportam genes de resistência adicionais. Estas enzimas hidrolisam todos os antibióticos β -lactâmicos, à excepção dos monobactâmicos (Poole, 2004). A primeira enzima da série IMP descrita pertence a uma estirpe clínica de *S. marcescens* no Japão (Watanabe *et al.*, 1991), enquanto as enzimas da série VIM foram inicialmente descritas num isolado clínico de *P. aeruginosa* em Itália (Lauretti *et al.*, 1999).

O aparecimento recente de genes de metalo- β -lactamases associados a elementos genéticos móveis, capazes de disseminação horizontal entre espécies de importância clínica, tem aumentado a atenção sobre estas enzimas, incluindo-as entre as maiores ameaças para o século XXI no campo da resistência microbiana a antibióticos (Bush, 1999).

1.4.2. Oxacilinases de classe D

Um número limitado de enzimas de classe D com alguma actividade contra os carbapenemos tem sido descrito, maioritariamente em *A. baumannii*: OXA-23 a OXA-27 (Nordmann e Poirel, 2002) e OXA-40 (Lopez-Otsoa *et al.*, 2002). Uma enzima cromossomal desta classe, OXA-23, foi também descrita em *P. mirabilis* (Bonnet *et al.*, 2002) e uma enzima, codificada por um plasmídeo, capaz de hidrolisar o imipenemo, foi também descrita em *K. pneumoniae* (Poirel *et al.*, 2004). As carbapenemases de classe D, embora apresentem fraca actividade contra os carbapenemos *in vitro*, são associadas à resistência aos carbapenemos *in vivo*, possivelmente devido à permeabilidade limitada das estirpes resistentes. Contrariamente à maioria das oxacilinases de classe D, as enzimas desta classe com actividade de carbapenemase são inibidas por um ou mais dos inibidores de β -lactamases disponíveis (Poole, 2004).

1.4.3. Carbapenemases de classe A

As β -lactamases de classe A com actividade contra os carbapenemos são pouco comuns. No entanto, algumas destas enzimas têm sido descritas em isolados de *Enterobacteriaceae* (Thomson e Moland, 2000; Bradford, 2001). Estas enzimas pertencem ao grupo funcional 2f, possuem serina no centro activo, são inibidas pelos inibidores de β -lactamases (mas não pelo EDTA) e representam o grupo funcional com o menor número de β -lactamases (Bush *et al.*, 1995). As enzimas deste grupo têm sido descritas em estirpes que também possuem β -lactamases do tipo AmpC; esta combinação de enzimas fornece resistência a uma gama diversa de compostos β -lactâmicos (Bush e Rasmussen, 1997).

Actualmente existem apenas oito enzimas caracterizadas como carbapenemases de classe A. Este pequeno grupo inclui as enzimas cromossomais NMC-A e IMI-1 de *E. cloacae* (Nordmann *et al.*, 1993; Rasmussen *et al.*, 1996), Sme-1 e 2 de *S. marcescens* (Yang *et al.*, 1990; Queenan *et al.*, 2000) e SFC-1 de *S. fonticola* (Henriques *et al.*, 2004), e as enzimas codificadas em plasmídeos KPC-1 de *K. pneumoniae* (Yigit *et al.*, 2001), KPC-2 descrita em *K. oxytoca* (Yigit *et al.*, 2003), *K. pneumoniae* (Moland *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003) e *S. enterica* serotipo Cubana (Miriagou *et al.*, 2003), e KPC-3, recentemente identificada em *K. pneumoniae* (Woodford *et al.*, 2004).

A enzima NMC-A foi a primeira carbapenemase de classe A identificada num isolado clínico de *E. cloacae*, em França em 1990 (Nordmann *et al.*, 1993). Esta enzima hidrolisa aminocarboxipenicilinas, cefalotina, imipenemo e aztreonamo sendo a sua actividade inibida pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. O gene da NMC-A é cromossomal e a sua expressão é indutível e regulada por um regulador do tipo LysR (Naas e Nordmann, 1994).

Sme-1 foi identificada em duas estirpes de *S. marcescens* recolhidas em Londres em 1982, antes do uso clínico dos carbapenemos (Yang *et al.*, 1990). Apesar de partilhar apenas 68% de homologia com a NMC-A (Naas *et al.*, 1994), esta enzima possui um perfil de hidrólise semelhante, e a sua expressão também é regulada por um regulador do tipo LysR (Naas *et al.*, 1995). Mais tarde, foi descrita uma β -lactamase mutante pontual de Sme-1, designada Sme-2, em estirpes de *S. marcescens* de localizações geográficas diferentes nos Estados Unidos (Queenan *et al.*, 2000).

A carbapenemase cromossomal IMI-1 foi identificada em duas estirpes de *E. cloacae* isoladas na Califórnia em 1984 (Rasmussen *et al.*, 1996). IMI-1 partilha 95%

de homologia com a enzima NMC-A, apresenta um perfil de hidrólise semelhante e é indutível devido a um regulador do tipo LysR (Rasmussen *et al.*, 1996).

A β -lactamase plasmídica KPC-1 foi identificada em *K. pneumoniae* e confere resistência aos carbapenemos, cefalosporinas de espectro alargado e aztreonamo (Yigit *et al.*, 2001). Esta β -lactamase apresenta fraca homologia ao nível molecular com as enzimas mais próximas: Sme-1 (45%), NMC-A (44%) e IMI-1(43%). Quando comparada com as carbapenemases cromossomais da mesma classe, pode referir-se que a actividade de KPC-1 é mais inibida pelo ácido clavulânico e tazobactam, e a sua expressão não é induzida. Posteriormente, foi descrita uma segunda β -lactamase plasmídica, KPC-2, de *K. oxytoca* (Yigit *et al.*, 2003). Esta enzima difere de KPC-1 por apenas um aminoácido, S174G, apresenta o mesmo espectro de actividade e também é inibida pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam (Yigit *et al.*, 2003). A enzima KPC-2, contrariamente a KPC-1, está localizada num transposão, aumentando o seu potencial para a disseminação (Yigit *et al.*, 2003). Recentemente, foi identificada uma nova variante KPC em *K. pneumoniae*, designada KPC-3. Esta enzima está codificada num plasmídeo e apresenta duas substituições nucleotídicas, relativamente a KPC-1, originando, possivelmente, duas substituições aminoacídicas de S174G, presente também em KPC-2, e H272Y. A proteína madura tem um peso molecular estimado de 28,503 kDa e um pI de 6,5 (Woodford *et al.*, 2004).

1.4.3.1. Caracterização bioquímica

As enzimas de *E. cloacae*, NMC-A e IMI-1, estão proximamente relacionadas ao nível molecular, têm perfis hidrolíticos semelhantes e pontos isoeléctricos quase neutros (tabela 3). A enzima Sme-1 de *S. marcescens*, embora funcionalmente semelhante a NMC-A e IMI-1, apresenta um ponto isoeléctrico muito básico (Rasmussen e Bush, 1997). A enzima KPC-1 apresenta fraca homologia ao nível molecular com as restantes carbapenemases, possuindo, no entanto, um ponto isoeléctrico próximo da neutralidade, semelhante às enzimas de *E. cloacae*. A nível molecular, não há conservação dos resíduos H105 e S237, resíduos considerados importantes para a actividade de carbapenemase. KPC-1 contém um triptofano na posição 105 e uma treonina na posição 237 (Yigit *et al.*, 2001).

Tabela 3. Características bioquímicas das carbapenemases de classe A (adaptado de Rasmussen e Bush, 1997).

| Enzima | Estirpe | IC ₅₀ para a inibição (μM) | | | Massa molecular (kDa) | pI |
|--------|---------------------------|---------------------------------------|-----|------|-----------------------|-----|
| | | AC | SUL | TZB | | |
| IMI-1 | <i>E. cloacae</i> 1413B | 0,28 | 1,8 | 0,03 | 30 | 7,1 |
| NMC-A | <i>E. cloacae</i> NOR-1 | 0,32 | 10 | 2 | 30 | 6,9 |
| Sme-1 | <i>S. marcescens</i> S6 | 14 | 3,3 | 3 | 32 | 9,7 |
| KPC-1 | <i>K. pneumoniae</i> 1534 | 1,2 | ND | 0,23 | ND | 6,7 |
| KPC-2 | <i>K. oxytoca</i> 3127 | 1,5 | ND | 0,18 | ND | 6,7 |

AC - ácido clavulânico; SUL - sulbactam; TZB - tazobactam; ND – não determinado.

De um modo geral, as carbapenemases pertencentes ao grupo 2f hidrolisam eficientemente as penicilinas, algumas cefalosporinas, os carbapenemos e os monobactâmicos. Atendendo aos valores dos parâmetros cinéticos (tabela 4), verifica-se que estas enzimas apresentam uma taxa de hidrólise mais elevada para a ampicilina e a cefaloridina do que para o imipenemo. Este facto tem sido apontado como uma explicação provável para o aparecimento deste tipo de enzimas em estirpes não expostas à pressão selectiva dos carbapenemos (Rasmussen e Bush, 1997). Estas enzimas são também caracterizadas por uma elevada constante de catálise, k_{cat} , ou elevada constante de Michaelis, K_m , para o aztreonamo, contrariamente às metaloenzimas. A hidrólise do imipenemo é mais rápida do que a hidrólise do meropenemo, um carbapenemo mais recente. O imipenemo é hidrolisado pela enzima KPC-1 mais lentamente do que pelas restantes carbapenemases de classe A. As enzimas Sme-1, NMC-A e IMI-1 apresentam uma actividade hidrolítica muito baixa em relação às cefalosporinas de espectro alargado, enquanto que a KPC-1 hidrolisa eficientemente a cefotaxima e, em menor extensão, a ceftazidima (Yigit *et al.*, 2001).

O efeito dos inibidores sobre estas enzimas é variável (tabela 3). Nenhuma das enzimas cromossomais é inibida eficientemente pelo sulbactam, com concentrações inibitórias para 50% superiores a 1 μM. Sme-1 apresenta uma inibição menos eficiente pelo ácido clavulânico, enquanto que as duas enzimas de *E. cloacae* são inibidas por concentrações inferiores a 1 μM. As enzimas KPC-1 e 2 são também inibidas pelo ácido clavulânico. O tazobactam é um fraco inibidor para IMI-1 e NMC-A, mas inibe Sme-1 e as enzimas KPC por concentrações inferiores a 1 μM. (Rasmussen *et al.*, 1996; Nordmann *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1990; Yigit *et al.*, 2001; Yigit *et al.*, 2003).

Tabela 4. Parâmetros da hidrólise das carbapenemases de classe A, de acordo com Yang *et al.*, 1990; Mariotte-Boyer *et al.*, 1996; Rasmussen *et al.*, 1996; e Yigit *et al.*, 2001, respectivamente.

| Substratos | $k_{cat}(s^{-1})$ | | | | $K_m(\mu M)$ | | | | $k_{cat}/K_m (mM^{-1}s^{-1})$ | | | |
|--------------|-------------------|-------|--------|-------|--------------|-------|-------|-------|-------------------------------|-------|-------|-------|
| | Sme-1 | NMC-A | IMI-1 | KPC-1 | Sme-1 | NMC-A | IMI-1 | KPC-1 | Sme-1 | NMC-A | IMI-1 | KPC-1 |
| Cefaloridina | 42 | ND | 2000 | 340 | 1100 | ND | 1070 | 560 | 38 | ND | 1900 | 610 |
| Cefalotina | ND | 2820 | 120 | 75 | ND | 185 | 130 | 53 | ND | 15200 | 920 | 1400 |
| Cefotaxima | 0.6 | 286 | 3.4 | 14 | 20 | 956 | 190 | 160 | 30 | 300 | 18 | 90 |
| Cefoxitina | 0.7 | 5 | 0.3 | 0,26 | 35 | 92 | 45 | 120 | 20 | 62 | 6.7 | 2 |
| Ceftazidima | ND | 4.7 | 0.0068 | 0,1 | ND | 90 | 270 | 94 | ND | 52 | 0.024 | 1 |
| Benzilpenic. | 3.6 | 260 | 36 | 32 | 66 | 28 | 64 | 23 | 55 | 9300 | 560 | 1400 |
| Ampicilina | 45 | ND | 190 | 110 | 600 | ND | 780 | 130 | 75 | ND | 240 | 850 |
| Imipenemo | 11 | 1040 | 89 | 12 | 32 | 92 | 170 | 81 | 344 | 11300 | 520 | 150 |
| Meropenemo | 0.4 | 12 | 10 | 3 | 7 | 4.35 | 26 | 12 | 57 | 2750 | 380 | 250 |
| Aztreonamo | ND | 707 | 51 | 20 | ND | 125 | 93 | 310 | ND | 5600 | 550 | 70 |

ND – não determinado.

1.4.3.2. Estrutura terciária

As carbapenemases de classe A constituem um grupo de enzimas particular, devido ao seu amplo espectro de hidrólise que compreende não só penicilinas e cefalosporinas clássicas mas também um conjunto de substratos considerados, normalmente, resistentes às enzimas de classe A (Matagne *et al.*, 1998; Rasmussen e Bush, 1997).

Este grupo de enzimas possui, no seu centro activo, cinco resíduos característicos: Cys-69, His-105, Arg-220, Ser-237 e Cys-238, que podem ser responsáveis pelo perfil de especificidade particular (Raquet *et al.*, 1997). Estudos de modelação desenvolvidos por Raquet e colaboradores (1997) demonstraram a presença de uma ponte dissulfito, entre Cys-69 e Cys-238, que cria uma nova ligação covalente entre os dois domínios destas proteínas. A ponte dissulfito modifica significativamente a posição da cadeia 3- β e, conseqüentemente, a geometria do centro activo (Fig. 5). Nas estruturas modeladas, o grupo carbonilo do imipenemo está mais próximo dos grupos NH dos resíduos 237 e 70 do que em TEM-1, o que melhora a interacção com a cavidade oxianião da enzima Sme-1 relativamente a TEM-1 (Raquet *et al.*, 1997). Sougakoff e colaboradores (2002) realizaram um estudo de mutagenese dirigida da β -lactamase Sme-1 substituindo a cisteína na posição 69 por uma alanina. A enzima mutante não foi capaz de catalisar a hidrólise de vários antibióticos, incluindo imipenemo, amoxicilina, ticarcilina, cefoxitina e aztreonamo, sugerindo que a ponte dissulfito pode ser necessária para a especificidade única da Sme-1 (Sougakoff *et al.* 2002), e das enzimas relacionadas.

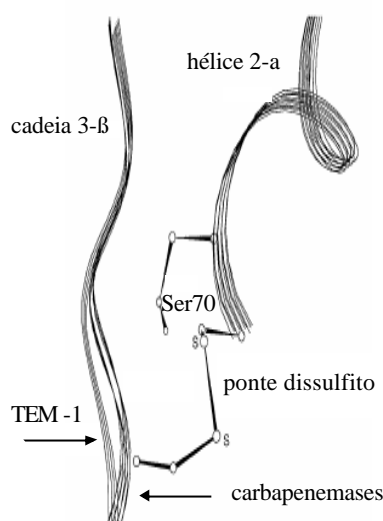


Figura 5. Modificação da posição da cadeia 3-β nas carbapenemases de classe A. A estrutura da β-lactamase TEM-1 é utilizada como referência. Adaptado de Raquet *et al.*, 1997.

A estrutura da enzima NMC-A obtida por cristalografia revelou várias diferenças estruturais na proximidade do centro activo relativamente a outras enzimas da mesma classe (Swären *et al.*, 1998), adicionalmente à ponte dissulfeto já descrita. Na estrutura da NMC-A, esta ligação covalente liga o terminal amina da hélice 2-a (que contém a Ser-70) à cadeia 3-β (230-237), que define uma região de ligação do substrato (Swären *et al.*, 1998). Outra característica importante desta enzima é a posição alterada da Asn-132, distanciada da cadeia 3-β, quando comparada com qualquer outra β-lactamase de classe A. Esta diferente localização pode ser importante na hidrólise de carbapenemos, uma vez que é fornecido mais espaço numa área importante para a interacção enzima-substrato, permitindo, teoricamente, o alojamento do substituinte 6a-1R-hidroxiethyl dos carbapenemos (Swären *et al.*, 1998), e provavelmente um posicionamento adequado da molécula de água catalítica para uma hidrólise eficiente (Matagne *et al.*, 1998).

Em adição à sua elevada actividade de carbapenemase, outra característica notável das enzimas NMC-A, Sme-1 e IMI-1 é a capacidade de hidrolisar compostos portadores de uma cadeia lateral metoxi no anel β-lactâmico (ex. cefoxitina e moxalactam) (Matagne *et al.*, 1998). Estudos de modelação com imipenemo e cefoxitina demonstraram que os substituintes do imipenemo e cefoxitina adoptam

posições semelhantes no centro activo da NMC-A, o que poderá explicar a actividade hidrolítica desta enzima sobre as (oxa)-cefamicinas (Mariotte-Boyer *et al.*, 1996).

1.5. O género *Serratia*

O género *Serratia* contém bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, geralmente móveis, indol-negativos, quimiorganotróficos e anaeróbicos facultativos. As estirpes deste género produzem enzimas extracelulares capazes de hidrolisar DNA, lípidos e proteínas. Algumas estirpes produzem pigmentos vermelhos característicos, designados prodigiosinas. Os organismos deste género ocorrem naturalmente no ambiente (solo, água, superfície das plantas, tracto digestivo de roedores, e insectos) ou como patogénicos humanos oportunistas (Grimont e Grimont, 1984).

A espécie mais estudada e conhecida é a espécie tipo, *Serratia marcescens*, um patogénico oportunista de pacientes imunodeprimidos, que causa infecções no tracto urinário e septicémia (Holt *et al.*, 1994). A maioria dos isolados clínicos produz uma β -lactamase indutível codificada pelo cromossoma (Richmond e Sykes, 1973), com homologia com cefalosporinases de classe C de outras *Enterobacteriaceae* (Nomura e Yoshida, 1990). Além da cefalosporinase cromossomal típica, as estirpes de *S. marcescens* geralmente produzem uma β -lactamase plasmídica de amplo espectro, do tipo TEM ou SHV, responsável pela resistência a penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, mas não a carbapenemos (Péduzzi, 1997). No entanto, já foram descritas estirpes de *S. marcescens* resistentes a carbapenemos. Este tipo de resistência pode dever-se à produção de uma metalo-enzima cromossomal (Osano *et al.*, 1994) ou plasmídica (Arakawa *et al.*, 1995), ou ainda pela produção da β -lactamase de classe A Sme-1, pertencente ao grupo funcional 2f (Yang *et al.*, 1990; Naas *et al.*, 1994), já referida anteriormente neste trabalho.

Outras espécies conhecidas do género são *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, *S. rubidaea*, *S. odorifera*, *S. ficaria* e *S. fonticola*. Estas espécies podem surgir envolvidas em bacteremia ou ser isoladas de puz sem, no entanto, apresentarem relevância a nível clínico (Grimont e Grimont, 1984).

A espécie *Serratia fonticola* inclui organismos vastamente distribuídos na natureza, que ocorrem naturalmente em águas ambientais (Gavini *et al.*, 1979), embora tenham sido também isolados do solo, moluscos e aves (Gavini *et al.*, 1979; Müller *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1986). Contrariamente a *S. marcescens* e a *S.*

liquefaciens, esta espécie raramente é encontrada em infecções humanas. No entanto, pode ser isolada do tracto respiratório (Farmer *et al.*, 1985) e actuar como agente infeccioso em feridas (Bollet *et al.*, 1991; Pfyffer, 1992). Recentemente foi descrita como responsável por uma infecção num paciente imunodeprimido (Soler *et al.*, 2000). Um estudo recente das susceptibilidades antimicrobianas de várias espécies de *Serratia* demonstrou que a espécie *Serratia fonticola* apresenta resistência natural à amoxicilina, ticarcilina e várias cefalosporinas e sensibilidade à amoxicilina/ácido clavulanânico, devido à expressão de uma β -lactamase cromossomal de classe A com elevada actividade de cefalosporinase (Stock *et al.*, 2003). Esta enzima de classe A possui elevada homologia com a β -lactamase isolada de *S. fonticola* CUV, caracterizada por Péduzzi e colaboradores (1997), com um pI de 8,12. Adicionalmente, esta espécie expressa uma β -lactamase do tipo AmpC específica da espécie, indutível (Stock *et al.*, 2003), tal como *S. marcescens* e outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Livermore, 1995).

Um estudo relativo à susceptibilidade a agentes antimicrobianos de populações bacterianas de águas de consumo não tratadas da região de Trás-os-Montes conduziu ao isolamento de uma nova estirpe de *S. fonticola*, resistente à carbenicilina e ao imipenemo. Esta estirpe foi designada UTAD54 (Saavedra *et al.*, 2003). O fenótipo de resistência da estirpe *S. fonticola* UTAD54 inclui, para além dos carbapenemos, penicilinas, cefalotina e cefuroxima, antibióticos aos quais outras estirpes da mesma espécie são sensíveis (Saavedra *et al.*, 2003).

Após pesquisa dos mecanismos de resistência da *S. fonticola* UTAD54 foi caracterizado um gene envolvido na resistência ao imipenemo, que codifica para uma metalo- β -lactamase designada Sfh-I, pertencente à subclasse Bb (Saavedra *et al.*, 2003).

Posteriormente, foi descrito um gene que codifica para uma nova β -lactamase da estirpe *S. fonticola* UTAD54, designada SFC-1 (Henriques *et al.*, 2004). A β -lactamase SFC-1 apresenta, a nível estrutural, elevada homologia com as carbapenemases de classe A, particularmente com KPC-1. Tal como descrito para a enzima KPC-1, não foi identificado qualquer gene regulador da expressão do gene *bla_{SFC-1}*. A enzima SFC-1 hidrolisa penicilinas, cefalotina e aztreonamo, apresenta susceptibilidade reduzida ao meropenemo e imipenemo, e a sua actividade é inibida pelos inibidores das β -lactamases, um padrão de resistência característico das carbapenemases de classe A (Henriques *et al.*, 2004).

1.6. Sistemas de expressão

É frequentemente desejável obter grandes quantidades de uma determinada proteína para efectuar estudos bioquímicos e, principalmente, estruturais. A clonagem do gene que codifica para a proteína em questão é uma das vias utilizadas para ultrapassar este problema. No entanto, a proteína é geralmente produzida em quantidades insuficientes (Snyder e Champness, 2003). De modo a produzir maiores quantidades de proteína, o gene correspondente deve ser clonado num vector de expressão. Um vector de expressão é um vector de clonagem construído por forma a que o gene aí inserido seja transcrito e/ou traduzido, após introdução no hospedeiro. Para transformação usam-se hospedeiros especiais, nomeadamente estirpes mutantes em que a degradação proteica é minimizada (Videira, 2001). Deste modo, é possível expressar a proteína codificada pelo gene clonado em grande quantidade ou fundi-la com outras proteínas mais fáceis de purificar (Snyder e Champness, 2003).

A maioria dos vectores de expressão é desenhada especificamente para *E. coli*. Uma parte essencial dos vectores de expressão é a existência de promotores reguláveis que, quando induzidos, permitam uma grande produção de RNA mensageiro. Os promotores reguláveis utilizados são, por exemplo, os promotores *lac* e *L-ara*. A proteína codificada pelo gene clonado é sintetizada apenas quando o promotor é activado. Estes vectores indutíveis são particularmente úteis se o produto do gene é tóxico para a célula (Snyder e Champness, 2003). Para a síntese de proteínas é também necessário que o RNA mensageiro possua sequências de ligação ao ribossoma, pequenas sequências próximas do codão metionina de iniciação, localizadas a seguir ao promotor e antes do local de clonagem (Videira, 2001).

Os vectores de expressão podem ser divididos em dois grupos: vectores de transcrição e vectores de tradução. Os primeiros transcrevem o gene clonado em RNA mensageiro a partir de um promotor presente no vector de expressão, mas o gene clonado é traduzido da própria região de iniciação de tradução; assim, genes de bactérias pouco relacionadas com *E. coli* ou genes de eucariotas, geralmente não podem ser expressos de um vector de transcrição. Num vector de tradução, o gene a ser expresso é fundido com a região de iniciação de tradução do vector originando a sua expressão, independentemente da origem. Os vectores de tradução traduzem qualquer gene, mas este deve ser clonado no vector de clonagem de maneira a que a sua grelha de leitura (ORF) seja fundida em fase com a região de iniciação de tradução do vector. Estas fusões são geralmente efectuadas recorrendo à técnica de

PCR. Outros problemas associados à expressão de proteínas em *E. coli* relacionam-se com a sua incapacidade de remover intrões dos genes clonados e de realizar modificações pós-tradução, comuns em eucariotas, tais como glicosilação e fosforilação (Snyder e Champness, 2003).

De modo a facilitar a purificação das proteínas recombinantes e resolver outros problemas, como estabilidade, solubilidade e níveis de expressão, é frequente produzir proteínas de fusão. Nestes casos, as sequências codificantes da proteína relevante são ligadas aos genes de outras proteínas que possuem características apropriadas (proteínas transportadoras). Outra possibilidade é a de expressar as proteínas com pequenas caudas (*tags*), colocadas nas extremidades N- ou C- terminal, que contribuem para uma fácil purificação e/ou detecção da proteína. Um exemplo típico é a cauda de histidinas, constituída por seis a dez resíduos de histidina consecutivos, que permite a purificação da proteína por cromatografia de afinidade. Na construção de proteínas de fusão é usual inserir no vector uma outra sequência que codifica uma sequência de aminoácidos que pode ser clivada por processos químicos ou por uma protease específica, de modo a clivar a proteína relevante da proteína transportadora ou da cauda, após a purificação (Videira, 2001).

Outro dos factores que influencia o nível de expressão de um gene é a força do promotor de transcrição. A região promotora é o local ao qual se liga inicialmente a RNA polimerase. Para a construção de um sistema funcional é importante incluir um promotor forte no vector de expressão. Os promotores fortes utilizados em *E. coli* incluem *lacuv 5* (controla a β -galactosidase), *trp* (controla a sintetase do triptofano), *tac* (híbrido sintético dos promotores *trp* e *lac*), entre outros (Brock *et al.*, 1994).

Um novo sistema regulador foi criado usando o promotor do bacteriófago T7 e a RNA polimerase (Studier *et al.*, 1990). Os vectores que usam este sistema são designados pET (*plasmid for expression by T7 RNA polymerase*) e são amplamente utilizados para sobreexpressão em larga escala de proteínas recombinantes em células procariotas e eucariotas (Spehr, *et al.*, 2000). O sistema utiliza a RNA polimerase do bacteriófago T7, (uma enzima extremamente activa), produzindo cadeias de RNA oito vezes mais rapidamente que a RNA polimerase de *E. coli* (Bonner *et al.*, 1994). Adicionalmente, a enzima é altamente específica e transcreve selectivamente os genes cuja expressão depende de promotores T7 (Chamberlin *et al.*, 1970). Esta RNA polimerase é colocada sob controlo de um promotor facilmente regulável e a expressão do gene clonado ocorre após a activação da enzima. Uma vez que esta reconhece

apenas promotores T7, transcreve apenas o gene clonado, enquanto que os genes do hospedeiro permanecem por transcrever, resultando em elevados níveis de transcrição do gene de interesse (Studier *et al.*, 1990; Rosenberg *et al.*, 1987). Utilizando este sistema mais de metade da totalidade das proteínas celulares pode ser constituída por proteína recombinante (Studier *et al.*, 1990).

2. OBJETIVOS

Um estudo que visava a caracterização de β -lactamases em *S. fonticola* conduziu à caracterização de um gene que codifica para uma nova β -lactamase da estirpe *S. fonticola* UTAD54 (Henriques, 2001). Esta β -lactamase foi denominada SFC-1 e a sequência de aminoácidos deduzida da sequência nucleotídica do gene *bla*_{SFC-1} indica que a enzima está relacionada com as carbapenemases de classe A, como por exemplo, KPC-1 e IMI-1 (Henriques *et al.*, 2004). No entanto, a percentagem de identidade com as sequências de aminoácidos dessas enzimas (62% e 50%, respectivamente), justifica um conhecimento mais detalhado das propriedades de SFC-1.

As carbapenemases apresentam a capacidade de hidrolisarem significativamente imipenemo e/ou meropenemo (Nordmann e Poirel, 2002). Estes antibióticos são os β -lactâmicos com o espectro de actividade mais alargado, utilizados como último recurso no tratamento de infecções bacterianas. A expressão de carbapenemases e a possível disseminação de resistência aos carbapenemos pode comprometer o uso destes antibióticos em terapia clínica. Para além disto, as carbapenemases de classe A possuem actividade contra o aztreonamo, o único antibiótico resistente às metalo- β -lactamases.

Um dos objectivos deste trabalho foi a expressão do gene *bla*_{SFC-1} num sistema de expressão apropriado à produção de uma elevada quantidade da enzima SFC-1.

Considerando que as proteínas recombinantes expressas em *E. coli* são frequentemente produzidas como agregados insolúveis, outro dos objectivos deste trabalho consistiu na determinação das condições óptimas de expressão da β -lactamase SFC-1 na sua forma solúvel e activa.

Foi também objectivo deste estudo estabelecer um protocolo de purificação, de modo a obter a enzima SFC-1 pura, em quantidade, no seu estado nativo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estirpes bacterianas e plasmídeos

As estirpes bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho, a sua origem e algumas das suas características, encontram-se na tabela 5.

Tabela 5. Estirpes bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho.

| Estirpes | Características | Origem e/ou referência |
|------------------------------------|---|--------------------------|
| <i>S. fonticola</i> UTAD54 | Isolado ambiental; | Saavedra (2000); UTAD |
| <i>S. fonticola</i> 7882 | Estirpe tipo da espécie <i>S. fonticola</i> ; | LMG |
| <i>E. coli</i> TOP10F ⁻ | Células competentes para clonagem; F ⁻ , <i>mrcA</i> ? (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F80 <i>lacZ</i> ?M15 ? <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> ? (<i>ara-leu</i>)7697 <i>ga/U</i> <i>ga/K rpsL endA1 nupG</i> | Invitrogen |
| <i>E. coli</i> XL2-Blue | Células supercompetentes para clonagem; <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac[F'proAB lacZ]?M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]^a</i> | Stratagene |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | Células competentes para expressão proteica; F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B m_B) gal dcm</i> (DE3) | Novagen |

Plasmídeos

| | | |
|------------|--|---------------|
| pTrcHis | Vector de expressão proteica derivado de pUC; Amp ^r | Invitrogen |
| pET-26b(+) | Vector de clonagem e expressão de proteínas recombinantes; Cam ^r | Novagen |
| pTrc5 | Plasmídeo recombinante; vector pTrcHis com inserto de 900 pb contendo o gene <i>bla_{SFC-1}</i> ; Amp ^r , Aztr ^r | Este trabalho |
| pMF13 | Plasmídeo recombinante; vector pET-26b(+) contendo o gene <i>bla_{SFC-1}</i> ; Cam ^r , Aztr ^r | Este trabalho |

Legenda: UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; LMG: Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent

3.2. Meios de cultura

Para todos os meios de cultura é dada a composição para volumes de 1 litro. Estes foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos, logo após a preparação. Os meios sólidos foram preparados de acordo com a composição apresentada para o meio líquido correspondente, com o suplemento de 2% de Agar - Agar (Merck).

Meio de LB (Luria-Bertani)

| | |
|----------------------|------|
| Tryptona | 10 g |
| Extracto de levedura | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| (pH 7,3) | |

Meio SOC

| | |
|----------------------|-------|
| Tryptona | 20 g |
| Extracto de levedura | 5 g |
| NaCl | 0,5 g |

Após dissolvidos os reagentes referidos, foram adicionados 10 ml de solução de KCl 250 mM. Ajustou-se o pH a 7,0 e o volume até 980 ml. O meio foi autoclavado 20 minutos a 121°C, deixou-se arrefecer até cerca de 55°C e adicionou-se 5 ml de MgCl₂ 2 M e 20 ml de glucose 1 M, previamente esterilizados por filtração com filtros 0,20 µm (Albet).

Meio de Mueller-Hinton

| | |
|---------------------|--------|
| Extracto de carne | 2 g |
| Amido | 1,5 g |
| Caseína hidrolisada | 17,5 g |
| (pH 7,0) | |

3.2.1. Aditivos para os meios de cultura

Os aditivos para os meios de cultura utilizados neste trabalho pertencem a duas categorias: antibióticos e um indutor de expressão proteica.

Os antibióticos ampicilina, canamicina (Sigma) e aztreonamo (Bristol-Myers Squibb) foram utilizados, neste trabalho, nas seguintes condições:

Ampicilina: Solução *stock* preparada a 50 mg/ml em água desionizada e usada a 50 µg/ml.

Canamicina: Solução *stock* preparada a 30 mg/ml em água desionizada e utilizada a 30 µg/ml.

Ambos os antibióticos acima descritos foram utilizados para selecção e manutenção de transformantes em procedimentos de clonagem e expressão de genes.

Aztreonamo: Solução *stock* preparada a 30 mg/ml em água desionizada. O aztreonamo foi utilizado a 5 µg/ml para selecção e manutenção de transformantes contendo o gene de resistência a este antibiótico.

Após a preparação as soluções de antibióticos foram esterilizadas por filtração, utilizando filtros de 0,20 µm de poro, e conservadas a -20°C.

Como indutor da expressão da proteína recombinante em estudo, utilizou-se o IPTG (Fermentas). A solução *stock* foi preparada a 100 mM em água desionizada, esterilizada por filtração com filtros de 0,20 µm de poro, e conservada a -20°C. Esta solução foi utilizada, em culturas bacterianas, numa concentração final de 1 mM.

3.3. Conservação de microrganismos

As estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho foram semeadas em placas de meio LA, suplementado com os antibióticos adequados nas concentrações já referidas. As placas foram mantidas a 4°C, e as estirpes foram repicadas para meio fresco sempre que necessário.

O crescimento das estirpes em meio líquido efectuou-se, a partir de colónias isoladas, em meio LB (suplementado com os antibióticos adequados) com agitação (200 a 250 rpm), incubando-se à temperatura adequada.

3.4. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos aos seguintes fabricantes: Merck (Darmstadt, Alemanha), Sigma Chemical Co (St. Louis, Missouri, EUA), GIBCO BRL (Eggenstein, Alemanha), Boheringer Mannheim/Roche (Mannheim, Alemanha), MBI Fermentas (Vilnius, Lituânia), Difco (Michigan, USA), Pharmacia (Uppsala, Suécia), Biorad (California, EUA).

3.5. Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos

3.5.1. Método de difusão em agar com tiras de antibióticos

Para a determinação das concentrações mínimas inibitórias (MICs) foi utilizado o método de difusão em agar com tiras, usualmente denominado Etest (Epsilon-test). Este teste baseia-se na utilização de tiras comerciais com dimensões de 5x50 mm, impregnadas com o antibiótico a testar em concentrações decrescentes, desde 256 a 0,016 mg/l. Estas tiras são colocadas sobre placas de agar Mueller-Hinton, previamente inoculadas com a estirpe em estudo.

O valor da concentração mínima inibitória (mg/l) corresponde ao ponto de intersecção entre o crescimento bacteriano e a tira de E-test. Os valores das concentrações mínimas inibitórias determinados permitiram classificar a estirpe nas categorias sensível, intermédia ou resistente de acordo com os critérios do NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 1995). O procedimento utilizado para inoculação e incubação das placas de Mueller-Hinton, definido de acordo com as normas do NCCLS, é descrito em seguida.

Técnica de difusão em agar com tiras de antibióticos

-
-
- 1- Preparar uma suspensão bacteriana com turvação equivalente a metade do grau 1 da escala de MacFarland (3-4 colónias) em soro fisiológico estéril.
 - 2- A partir desta suspensão, inocular placas de agar Mueller-Hinton, utilizando uma zaragatoa.
 - 3- Deixar secar o inóculo e aplicar as tiras dos antibióticos a testar sobre a superfície do meio de cultura.
 - 4- Incubar a 37°C, durante 18 horas.
 - 5- Registar o valor da concentração mínima inibitória (mg/l) correspondente a cada antibiótico.
-
-

3.6. Marcadores de peso molecular

3.6.1. Marcador de ácidos nucleicos

O tamanho dos fragmentos de DNA foi determinado por comparação com a migração de fragmentos de peso molecular conhecido (Southern, 1975). Para tal, foi utilizado o marcador de peso molecular Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas).

3.6.2. Marcador de proteínas

Para estimar o tamanho da proteína em estudo foi utilizado o marcador de peso molecular Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Amersham Biosciences). Este marcador é constituído por uma mistura de seis proteínas com pesos moleculares de 97, 66, 45, 30, 20,1 e 14,4 kDa.

3.7. Preparação de DNA

3.7.1. Preparação de DNA total

O DNA total da estirpe *Serratia fonticola* UTAD54 foi preparado, a partir de culturas líquidas em meio LB, utilizando o sistema comercial "Genomic DNA Purification Kit" (MBI Fermentas), para utilização em reacções de PCR.

Preparação de DNA total ("Genomic DNA Purification Kit")

- 1- Incubar a estirpe em 5 ml de meio LB, durante 16-18 horas, a 250 rpm.
- 2- Sedimentar as células por centrifugação, durante 5 minutos a 14 000 rpm. Ressuspender em 200 µl de TE.
- 3- Adicionar 400 µl de Solução de Lise (MBI Fermentas). Misturar vigorosamente. Incubar 10 minutos a 65°C. A solução deve apresentar-se viscosa e transparente.
- 4- Adicionar 600 µl de clorofórmio e agitar até que as fases se misturem. Centrifugar 2 minutos a 10 000 rpm.
- 5- Preparar a solução de precipitação adicionando a 720 µl de água estéril 80 µl de Solução de Precipitação Concentrada (MBI Fermentas).
- 6- Transferir a fase aquosa para um microtubo novo.
- 7- Adicionar a solução de precipitação à fase aquosa e misturar suavemente. Incubar 15 minutos à temperatura ambiente.
- 8- Centrifugar 2 minutos a 10 000 rpm.
- 9- Ressuspender o precipitado em 100 µl de uma solução de NaCl a 1,2 M. Adicionar 2 µl de uma solução de RNase a 10 mg/ml. Incubar 10 minutos a 37 °C.
- 10- Adicionar 3 volumes de etanol frio. Deixar precipitar durante 15 minutos a -20 °C.
- 11- Centrifugar 3-4 minutos a 12 000 rpm.
- 12- Lavar o DNA com etanol a 70 %.
- 13- Ressuspender em 100 µl de TE. Conservar a -20 °C.

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA.

3.7.2. Preparação de DNA plasmídico

A extração dos plasmídeos recombinantes foi efectuada utilizando o sistema CONCERT™ High Purity Plasmid Miniprep System (Gibco BRL). O DNA plasmídico assim obtido foi utilizado em digestões com endonucleases de restrição e em reacções de sequenciação. O sistema foi usado de acordo com a metodologia aconselhada pelo fabricante.

Preparação de DNA plasmídico (CONCERT™ High Purity Plasmid Miniprep System)

- 1- Inocular a estirpe em 5-10 ml de meio LB suplementado com antibiótico. Incubar 14-16 horas a 37°C com agitação.
- 2- Colocar uma coluna (Gibco BRL) num tubo de 12 ml. Aplicar 2 ml de Tampão de Equilíbrio (E4) (Gibco BRL) à coluna. Deixar a solução drenar por gravidade.
- 3- Para plasmídeos de elevado número de cópias, centrifugar 1 a 3 ml de cultura durante 5 minutos a 14 000 rpm de modo a remover todo o meio de cultura. No caso de plasmídeos de baixo número de cópias, centrifugar 10 a 15 ml de cultura.
- 4- Adicionar 400 µl de Tampão de Suspensão (E1) (Gibco BRL) (ao qual foi previamente adicionada RNase para uma concentração final de 100 µg/ml) e ressuspender as células até obter uma solução homogénea.
- 5- Adicionar 400 µl de Solução de Lise (E2) (Gibco BRL). Agitar suavemente invertendo o tubo fechado cinco vezes. Incubar 5 minutos à temperatura ambiente.
- 6- Adicionar 400 µl de Tampão de Neutralização (E3) (Gibco BRL) e mexer imediatamente invertendo o tubo 4-6 vezes. Centrifugar 10 minutos a 14 000 rpm à temperatura ambiente.
- 7- Pipetar o sobrenadante para a coluna equilibrada. Deixar a solução drenar e descartar o líquido.
- 8- Lavar a coluna duas vezes com 2,5 ml de Tampão de Lavagem (E5) (Gibco BRL). Deixar a solução drenar por gravidade, após cada lavagem, e descartar o líquido.
- 9- Eluir o DNA adicionando 0,9 ml de Tampão de Eluição (E6) (Gibco BRL).
- 10- Adicionar 0,63 ml de isopropanol ao eluato. Mexer e centrifugar a 14 000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Descartar o sobrenadante cuidadosamente.
- 11- Lavar o sedimento de DNA plasmídico com 1 ml de etanol 70% e centrifugar a 14 000 rpm a 4°C durante 5 min. Cuidadosamente, pipetar todo o etanol e descartar.
- 12- Incubar 10 minutos à temperatura ambiente para secar o sedimento.
- 13- Ressuspender o sedimento de DNA em 50 µl de água estéril. Ocasionalmente podem estar presentes partículas insolúveis que podem ser removidas por centrifugação a 14 000 rpm durante 1 minuto.
- 14- Transferir a amostra para um tubo limpo. Guardar a -20°C.

3.8. Hidrólise de DNA por Endonucleases de Restrição

As enzimas de restrição foram obtidas das firmas Roche e MBI Fermentas, e foram utilizadas de acordo com as recomendações do fabricante. As digestões dos fragmentos de DNA amplificados por PCR e de DNA plasmídico efectuaram-se em volumes totais de 20 μ l contendo 0,2 a 5 μ g de DNA (Sambrook *et al.*, 1990). Foram usadas de 1 a 5U de enzima por μ g de DNA. As condições relativas à temperatura de incubação e ao tampão a utilizar, foram estabelecidas também de acordo com as recomendações do fabricante.

3.9. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

As reacções de PCR foram efectuadas em volumes de 50 μ l e decorreram num termociclador iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Os reagentes (tampões, dNTPs e $MgCl_2$) e enzima (*Taq* DNA polimerase) foram adquiridos a MBI Fermentas e utilizados nos volumes a seguir indicados.

| | Volume | Concentração final |
|-----------------------------------|-------------|--------------------|
| H ₂ O | variável | ----- |
| 10x PCR buffer s/ $MgCl_2$ | 2,5 μ l | 0,5x |
| 10x PCR buffer c/ $(NH_4)_2 SO_4$ | 2,5 μ l | 0,5x |
| $MgCl_2$ | 6 μ l | 3 mM |
| dNTP's | 5 μ l | 200 μ M |
| "Primer" 1 | 1,5 μ l | 0,3 μ M |
| "Primer" 2 | 1,5 μ l | 0,3 μ M |
| DNA molde | variável | 50-100 ng |
| Taq polimerase 1U/ μ l | 1 μ l | 1 U |

O programa utilizado para a amplificação do fragmento *bla*_{SFC-1} foi o descrito anteriormente (Henriques, 2001): desnaturação inicial de 7 minutos a 94°C seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C, 1 minuto; hibridação a 60°C, 1 minuto; extensão a 72°C, 1 minuto) e extensão final de 10 minutos a 72°C. No final, uma alíquota de 5 μ l foi visualizada num gel de agarose de 1% em TAE 1x.

Os fragmentos amplificados por PCR destinados a hidrólise por endonucleases de restrição e a determinação da sequência nucleotídica foram purificados utilizando o sistema "kit Concert™ Rapid PCR Purification System", pelo método que se descreve em seguida.

Purificação de produtos de PCR (kit CONCERT™ Rapid PCR Purification System)

- 1- Adicionar 400 µl de solução H1 (Binding Solution - Gibco BRL) à reacção de PCR e misturar.
- 2- Colocar uma coluna (Gibco BRL) num tubo de 2 ml. Transferir a amostra para a coluna.
- 3- Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 minuto.
- 4- Remover o líquido recolhido no tubo. Colocar novamente a coluna no tubo de 2 ml.
- 5- Lavar a coluna com 700 µl de tampão H2 (Wash Buffer - Gibco BRL). Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 minuto. Descartar o líquido no tubo.
- 6- Centrifugar novamente nas mesmas condições para remover restos de tampão 2.
- 7- Colocar a coluna num tubo de 1,5 ml. Adicionar 50 µl de TE previamente aquecido directamente no centro da coluna.
- 8- Incubar durante 2 minutos à temperatura ambiente. Recolher a amostra por centrifugação a 14 000 rpm durante 2 minutos.

3.10. Electroforese

3.10.1. Electroforese de DNA em gel de agarose

Os géis de agarose (Ultra Pure™ da Gibco BRL) foram preparados a concentrações de 1%, e as electroforeses decorreram a voltagens de 1 a 4 V/cm em tampão TAE 1x (Sambrook *et al.*, 1990). As amostras foram carregadas no gel após adição de 1/6 de volume de tampão de carga.

TAE 50x

40 mM Tris base

40 mM Acetato

2 mM EDTA

(pH 8,0)

Tampão de carga 6x

0,25% bromofenol

0,25% xileno cianol

40% sacarose ou 30% glicerol

(pH 8,0)

3.10.1.1. Visualização de DNA

Os géis foram corados numa solução de brometo de etídio (EtBr) a 5 µg/ml, em tampão de electroforese, durante cerca de 20 minutos.

Após a coloração, o DNA foi visualizado num transiluminador de luz UV sendo digitalizado num Personal Molecular Imager™ FX System (Bio-Rad), com o software Quantity One® 1-D Image Analysis Software (BIORAD).

3.10.2. Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Os géis de poliacrilamida foram preparados de acordo com o sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970), utilizando um gel de separação a 15% e um gel de concentração a 4%. As electroforeses foram realizadas em tampão Tris-Bicina a 100 mM, 0,1% SDS utilizando o sistema Mini-Protean® 3 Cell, da Bio-Rad, ligado a um sistema gerador de diferenças de potencial eléctrico, PowerPac 300 da Bio-Rad.

3.10.2.1. Preparação das amostras

As amostras foram incubadas a 100°C, durante 5 minutos, na solução de desnaturação (1:1/ v:v). Esta solução contém 2% de β-mercaptoetanol (v/v), 100 mM de Tris-Bicina, 2% de SDS (m/v) e 8 M de ureia.

As amostras foram aplicadas de seguida, após arrefecimento, ou reservadas a – 20°C, até análise.

3.10.2.2. Separação das proteínas

Após a montagem do suporte, de acordo com as instruções do fabricante, prepararam-se os géis de poliacrilamida. Os reagentes foram utilizados nas concentrações e volumes a seguir indicados

Gel de separação

| | |
|--|---------|
| Água desionizada | 2,9 ml |
| Tris 1,5 M a pH 8,8 | 3,35 ml |
| Acrilamida:bis-acrilamida 29:1 a 40% (v/v) (Bio-Rad) | 3,75 ml |
| SDS a 10% (m/v) | 200 µl |
| Persulfato de amónia a 10% (m/v) | 50 µl |
| TEMED (Sigma) | 5 µl |

Gel de concentração

| | |
|----------------------------------|---------|
| Água desionizada | 3,26 ml |
| Tris 0,625 M a pH 6,8 | 1,25 ml |
| Acrilamida a 40% (v/v) | 488 µl |
| SDS a 10% (m/v) | 100 µl |
| Persulfato de amónia a 10% (m/v) | 50 µl |
| TEMED | 2,5 µl |

Após polimerização dos géis, removeram-se os pentes e colocaram-se os suportes na tina de separação contendo o tampão Tris-Bicina 100 mM e SDS 0,1% (m/v). As electroforeses foram efectuadas a voltagem constante, 130 V, durante 120 minutos.

3.10.2.3. Detecção das proteínas

A revelação dos géis para detecção de proteínas fez-se por coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Sigma). Os géis foram incubados numa solução com o corante a 0,4% (m/v), 50% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, e sob agitação. De seguida efectuou-se a descoloração dos géis com uma solução de 25% (v/v) de etanol e 5% (v/v) de ácido acético.

Após coloração, os géis foram digitalizados num GS-710™ Imaging Densitometer, com o software Quantity One® 1-D Image Analysis Software (Bio-Rad).

3.11. Determinação de sequências nucleotídicas a partir de DNA plasmídico – Sequenciação cíclica

A preparação das reacções de sequenciação e a purificação dos produtos das reacções foram efectuadas de acordo com a metodologia abaixo descrita.

Sequenciação cíclica de fragmentos de DNA plasmídico

- 1- Extrair DNA plasmídico utilizando o sistema CONCERT™ High Purity Plasmid Miniprep System, como descrito anteriormente.
- 2- Preparar a seguinte reacção de PCR para sequenciação cíclica (20 μ l), com reagentes do *kit ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante:

| | Volume | Concentração final |
|-------------------------|-------------|--------------------|
| H ₂ O | variável | ----- |
| Term Ready Reaction Mix | 8 μ l | 4x |
| DNA | variável | 150-300 ng |
| "Primer" | 1,6 μ l | 3,2 pmol |

- 3- Proceder à amplificação por PCR, de acordo com um programa de 30 ciclos de amplificação: 10 seg de desnaturação a 96°C, 5 seg de hibridação a temperatura adequada e extensão a 60°C durante 4 min. No final, os tubos devem ser mantidos a 4°C.
- 4- Purificar os produtos da reacção por precipitação acetato de sódio/etanol do seguinte modo:
 - 4.1- Para cada reacção de PCR misturam-se, em tubos de 1,5 ml, 2 μ l de acetato de sódio 3M (pH 4,6) com 50 μ l de etanol 95%.
 - 4.2- Pipetar o conteúdo total de cada reacção de PCR para um tubo com a mistura anterior.
 - 4.3- Deixar à temperatura ambiente durante 20 minutos.
 - 4.4- Centrifugar durante 20 minutos à velocidade máxima.
 - 4.5- Remover o sobrenadante e ressuspender em 250 μ l de etanol 70%.
 - 4.6- Centrifugar durante 5 minutos à velocidade máxima.
 - 4.7- Retirar o sobrenadante.
 - 4.8- Colocar os tubos numa placa de aquecimento a 90°C, durante 1 minuto.
- 5- Guardar as amostras a -20°C até serem injectadas no sequenciador.

A análise dos fragmentos de DNA plasmídico foi efectuada utilizando o sequenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

3.12. Técnicas utilizadas na clonagem de fragmentos de DNA

As técnicas a seguir descritas foram aplicadas na clonagem de fragmentos de DNA obtidos por digestão com enzimas de restrição, após amplificação por PCR.

Neste trabalho foram utilizados dois sistemas distintos para a expressão de um gene que codifica para uma β -lactamase da estirpe *S. fonticola* UTAD54: o sistema Xpress™ System Protein Expression TrcHis (Invitrogen) e o sistema pET System

(Novagen). O sistema TrcHis utiliza o vector pTrcHis, com resistência à ampicilina e a estirpe hospedeira *E. coli* TOP10F'. No sistema pET foi utilizado o vector pET-26(+) resistente à canamicina e a estirpe *E. coli* BL21(DE3) como estirpe hospedeira de expressão.

Para além das células competentes fornecidas com os sistemas de expressão, foram também utilizadas as células competentes *E. coli* XL2-Blue para a estabilização do vector pET recombinante e obtenção de elevada eficiência de transformação, como aconselhado pelo fabricante do sistema.

As metodologias usadas foram as indicadas pelos fabricantes dos sistemas de expressão.

3.12.1. Preparação de fragmentos de DNA

Após digestão foi efectuada uma precipitação das reacções de digestão, do vector e dos produto de PCR, de modo a eliminar os sais presentes nas reacções, que poderiam inibir as reacções seguintes (ex. ligação). O procedimento é descrito de seguida.

Precipitação das reacções de digestão

-
-
- 1- Adicionar a cada reacção 80 µl de água desionizada estéril e 100 µl de isopropanol.
 - 2- Incubar a -20°C durante 1 hora.
 - 3- Centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm e descartar cuidadosamente o sobrenadante.
 - 4- Deixar secar à temperatura ambiente.
 - 5- Ressuspender o DNA em 20 µl de água desionizada estéril.
 - 6- Observar uma alíquota de cada reacção num gel de agarose a 1% em TAE 1x e guardar o restante a -20°C.
-
-

3.12.2. Ligação de fragmentos de DNA

A enzima DNA ligase do fago T4 foi utilizada para unir covalentemente fragmentos de DNA originados por digestão com enzimas de restrição. Esta enzima catalisa as ligações fosfodiester entre os extremos 3'-OH e 5'-P do DNA.

As reacções de ligação realizaram-se na presença do tampão recomendado pelo fabricante. Este tampão inclui na sua composição o ião Mg^{2+} e ATP, cofactores requeridos pela enzima.

Ligação de fragmentos originados por digestão com enzimas de restrição

- 1- Num microtubo preparar a reacção de ligação, segundo a seguinte composição:
 - x ng de vector (utilizaram-se geralmente 50 a 100 ng)
 - y ng do fragmento de DNA a ligar
 - Tampão de ligase 1x (1 μ l da solução 10x)
 - 1 Unidade de enzima
 - água até um volume final de 10 μ l
 - 2- Incubar a reacção a 14°C durante 14-16 horas.
 - 3- A reacção pode ser imediatamente utilizada ou armazenada a -20°C.
-

3.12.3. Introdução de DNA em *E. coli*

Os produtos das reacções de ligação foram introduzidos em células competentes de *E. coli*, seguindo um protocolo fornecido pelo sistema pTrcHis (Invitrogen). Este procedimento foi utilizado para todas as transformações realizadas.

Transformação de células competentes de *E. coli*

- 1- Descongelar em gelo uma alíquota (50-200 μ l) das células competentes a utilizar.
 - 2- Adicionar 2-10 μ l da reacção de ligação às células competentes misturando suavemente. Manter em gelo por 30 minutos.
 - 3- Submeter as células a um choque térmico durante 45 segundos a 42°C. Colocar novamente em gelo durante 2 minutos.
 - 4- Adicionar 1 ml de meio SOC. Incubar durante 1 hora a 37°C e a 250 rpm.
 - 5- Semear 10-200 μ l da transformação em placas de meio LA suplementado com o antibiótico adequado, e quando necessário X-Gal e IPTG.
 - 6- Incubar as placas a 37°C durante 16-18 horas.
-

3.12.4. Análise de recombinantes

A confirmação da inserção correcta do fragmento clonado foi efectuada utilizando vários métodos: PCR a partir de DNA total de colónias, análise do DNA plasmídico recombinante com endonucleases de restrição e sequenciação cíclica.

A extracção de DNA total de colónias foi realizada de acordo com o método a seguir descrito. O DNA plasmídico de clones cujo inserto foi amplificado, foi posteriormente extraído utilizando o sistema CONCERT™ High Purity Plasmid Miniprep System, como anteriormente descrito.

O procedimento utilizado para a digestão de DNA plasmídico recombinante com enzimas de restrição, bem como para a sequenciação cíclica foram aqueles já descritos anteriormente.

Extracção de DNA total de colónias

-
-
- 1- Colocar 5 µl de água desionizada estéril num microtubo estéril.
 - 2- Repicar um clone “positivo” com um palito estéril e depositar no microtubo.
 - 3- Incubar 10 minutos a 100°C.
 - 4- Centrifugar alguns segundos.
 - 5- Utilizar 4 µl como DNA molde para a reacção de PCR.
-
-

3.13. Ensaaios de expressão

3.13.1. Produção da proteína recombinante

Uma vez que cada proteína recombinante apresenta diferentes características que podem afectar parâmetros de expressão óptimos, é útil seguir a expressão da proteína recombinante durante algum tempo para determinar o tempo óptimo para a expressão da proteína, bem como as suas propriedades de solubilidade.

Um ensaio de expressão foi efectuado para determinar o tempo de pós-indução ao qual correspondia uma maior quantidade de enzima recombinante activa. Este ensaio foi realizado para os dois sistemas, para testar a presença do indutor e o tempo de indução, a diferentes temperaturas: 25°C, 30°C e 37°C. O protocolo seguido foi o cedido pelos fabricantes.

Ensaio para a optimização das condições de produção proteica

-
-
- 1- Inocular 2 ml de meio LB, com os antibióticos adequados, com uma colónia de *E. coli* recombinante isolada. Incubar durante a noite (18 horas) a 37°C com agitação.
 - 2- No dia seguinte, inocular 100 ml de meio LB com antibiótico com 0,4 ml da cultura crescida.
 - 3- Incubar a 37°C com agitação até uma densidade óptica (600nm) de 0,6.
 - 4- Dividir a cultura em dois erlenmeyers. Adicionar, a um dos erlenmeyers, IPTG de uma solução stock 100 mM para uma concentração final de 1 mM.
 - 5- Incubar à temperatura de expressão a testar, com agitação vigorosa.
 - 6- Retirar amostras de 1 ml a um intervalo de 1 hora durante 5 horas (ou mais). Colocar as amostras em gelo durante 5 minutos. Centrifugar as células a 14 000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. Guardar o sobrenadante para análise posterior.
 - 7- Ressuspender as células em 0,25 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 e congelar a -20°C.
-
-

Para a preparação dos extractos proteicos, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, sonicadas 3 vezes durante 15 segundos (1 ciclo completo com amplitude 50%), mantendo as células em gelo, com intervalos de 1 minuto. O conteúdo solúvel foi separado das partículas insolúveis por centrifugação a 14 000 rpm, a 4°C, durante 15 minutos. No final reservou-se o sobrenadante, constituído pela fracção de proteínas solúveis, e guardou-se congelado a - 20°C até à sua utilização.

3.13.2. Análise da actividade β -lactâmica

A actividade β -lactâmica da proteína em estudo foi determinada por coloração de géis de poliacrimamida com o substrato cromogénico nitrocefina e por ensaios de actividade por análise contínua da hidrólise de um substrato por espectrofotometria.

A metodologia utilizada para a detecção da actividade β -lactâmica por SDS-PAGE foi adaptada a partir de Stock *et al.* (2003). Preparou-se um gel de poliacrilamida a 15% e separaram-se os extractos utilizando as condições já descritas no ponto 3.10.2. Após separação dos extractos, incubou-se o gel de poliacrilamida numa solução de Triton X-100 a 2,5% durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação. As bandas com actividade de β -lactamase foram postas em evidência inundando o gel com uma solução de nitrocefina a 100 μ M. A hidrólise do nitrocefina gera um composto corado que permite identificar β -lactamases nativas num gel de poliacrilamida.

A actividade enzimática foi determinada utilizando o aztreonamo como substrato. A hidrólise deste substrato foi monitorizada pelo registo contínuo da variação da absorvância a 318 nm ($\epsilon = 640 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Poirel *et al.*, 2000). A absorvância foi medida num espectrofotómetro Cary 50 BIO da Varian ligado a um computador, utilizando o “software” Cary WinUV. Os ensaios cinéticos foram realizados à temperatura ambiente, adicionando uma quantidade variável de extracto, dependendo da amostra, a 100 μ l de aztreonamo 1 mM em tampão fosfato de sódio a 50 mM e pH 7,0, num volume final de 1 ml. Nestes ensaios usou-se uma célula de quartzo com 1 cm de espessura. Sempre que necessário, a amostra foi diluída no tampão do ensaio de modo a obter uma actividade enzimática mensurável no espectrofotómetro. A actividade enzimática foi calculada utilizando a relação de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

em que **A** representa a variação da absorvância, ϵ o coeficiente de extinção molar em $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, **c** a concentração de produto formado em M, e **l** a espessura da célula em cm.

3.14. Produção da β -lactamase SFC-1

A produção da β -lactamase SFC-1 foi efectuada nas condições determinadas no ensaio de expressão. O procedimento utilizado foi adaptado do protocolo cedido pelo fornecedor Novagen.

Produção da proteína recombinante

- 1- Inocular uma colónia de *E. coli* recombinante isolada em 2 ml de meio LB, com os antibióticos adequados. Incubar durante a noite (18 horas) a 37°C com agitação.
- 2- No dia seguinte, inocular 0,4 ml da cultura crescida em 500 ml de meio LB com canamicina 30 $\mu\text{g/ml}$.
- 3- Incubar a 37°C com agitação até uma densidade óptica (600nm) de 0,6.
- 4- Incubar, com agitação vigorosa, à temperatura de expressão e durante o tempo pré-determinados.
- 5- Colocar os erlenmeyers em gelo durante 5 minutos. Centrifugar as células a 14 000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- 6- Ressuspender as células em 100 ml de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0.
- 7- Centrifugar novamente a 14 000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- 8- Ressuspender as células em 5 ml de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 e congelar durante a noite (18 horas) a -20°C.
- 9- Preparar os extractos proteicos de acordo com a metodologia descrita no ponto 3.13.1.

3.15. Purificação da β -lactamase SFC-1

3.15.1. Cromatografia

Os extractos proteicos destinados à purificação da proteína SFC-1, preparados de acordo com o método acima descrito, foram sujeitos a filtração por filtros de 0,20 μm de poro.

As cromatografias foram efectuadas à temperatura ambiente, num sistema cromatográfico automatizado AKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) incluindo uma bomba P-920 e um detector UPC-900 de UV com um sistema de condutividade

associado. O sistema foi controlado pelo “software” UNICORN versão 3.2. Todos os tampões foram filtrados através de uma membrana com um poro de 0,2 μ m e desgaseificados com Hélio, antes da sua utilização. A absorvância do eluato foi medida continuamente a 280 nm.

A purificação iniciou-se com a aplicação do filtrado (~6 ml) a uma coluna de troca catiónica SP Sepharose™ High Performance (Amersham Pharmacia Biotech), previamente equilibrada com fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0, a um fluxo de 3 ml/min. A eluição foi realizada com um gradiente linear de cloreto de sódio 0 –1 M, a um fluxo de 3 ml/min.

A fracção com actividade β -lactâmica (~10 ml) foi aplicada numa coluna de cromatografia de exclusão molecular, Superdex™ 75 (Amersham Pharmacia Biotech), pré-equilibrada com fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. A cromatografia decorreu a um fluxo de 1 ml/min.

A pureza da preparação da SFC-1 foi determinada por SDS-PAGE.

A remoção de sais foi efectuada por diálise da fracção activa recolhida da cromatografia de exclusão molecular (~11,2 ml) contra água ultra-pura, durante 36 horas, com agitação a 4°C. Foram utilizadas membranas de diálise com *cut-off* de 12 400 Da (Sigma). A solução da SFC-1 pura foi dividida em alíquotas e guardada congelada a -20°C.

3.15.2. Determinação da quantidade de SFC-1

Para análise quantitativa da SFC-1 pura, usou-se um método colorimétrico com o ácido bicinconínico (BCA) através do *kit* comercial de quantificação BCA (Pierce). Os ensaios de quantificação foram realizados seguindo as instruções do fabricante, tendo sido usada albumina sérica bovina como padrão.

Quantificação de proteína total ("BCA Protein Assay Reagent Kit")

- 1- Preparar os padrões de albumina (BSA) diluídos. Utilizando a tabela apresentada, preparar um conjunto de padrões diluindo o conteúdo de uma ampola de albumina padrão em vários microtubos limpos, usando, de preferência, a mesma solução diluente da amostra.

| Microtubo | Volume de diluente (µl) | Volume de BSA | Concentração final de BSA (µg/ml) |
|-----------|-------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| A | 700 | 100 µl de stock | 250 |
| B | 400 | 400 µl da diluição A | 125 |
| C | 450 | 300 µl da diluição B | 50 |
| D | 400 | 400 µl da diluição C | 25 |
| E | 400 | 100 µl da diluição D | 5 |
| F | 400 | 0 | 0 = Branco |

- 2- Preparar o reagente de trabalho BCA:
 - 2.1- Calcular o volume de reagente necessário. É necessário 1 ml de reagente por amostra por replicado.
 - 2.2- Preparar o reagente misturando 50 partes de reagente BCA A com 1 parte de reagente BCA B. Mexer até ficar com cor verde.
- 3- Pipetar 50 µl de cada padrão e amostra para o respectivo tubo teste.
- 4- Adicionar 1 ml de reagente de trabalho a cada tubo e mexer bem.
- 5- Incubar 30 minutos a 60°C.
- 6- Deixar arrefecer os tubos à temperatura ambiente.
- 7- Medir a absorvância de todas as amostras a 562 nm.
- 8- Preparar uma curva padrão. Utilizando a curva padrão, determinar a concentração de proteína total de cada amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho aqui apresentado foi desenvolvido com o objectivo de se obter uma grande quantidade da β -lactamase SFC-1 e proceder também à sua purificação. Para isso, utilizaram-se dois sistemas de expressão diferentes e determinaram-se as condições mais favoráveis à obtenção de uma elevada quantidade de enzima activa. Em seguida, foi estabelecido um protocolo de purificação.

4.1. Sobreexpressão de *bla*_{SFC-1} em *E. coli*

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é um dos hospedeiros mais utilizados para a produção de proteínas heterólogas, uma vez que as suas características genéticas estão bem estudadas, relativamente a qualquer outro microrganismo. Algumas das características responsáveis pela sua vasta utilização são: a capacidade de crescer rapidamente e atingir elevada densidade em substratos pouco dispendiosos, o conhecimento das suas características genéticas, e a disponibilidade de um grande número de vectores de clonagem e estirpes mutantes (Baneyx, 1999; Schumann e Ferreira, 2004).

4.1.1. Caracterização dos sistemas de expressão

A produção de proteínas recombinantes envolve a clonagem do gene apropriado num vector de expressão sob controlo de um promotor indutível. No entanto, a expressão eficiente do gene recombinante depende de uma variedade de factores, tais como sinais de expressão óptimos (ao nível da transcrição e tradução), enrolamento correcto da proteína e características de crescimento das células hospedeiras (Schumann e Ferreira, 2004).

Neste trabalho foram utilizados dois sistemas diferentes para a expressão de *bla*_{SFC-1} da estirpe *S. fonticola* UTAD54: o sistema Xpress™ System Protein Expression TrcHis (Invitrogen) e o sistema pET System (Novagen).

O sistema TrcHis utiliza um vector de elevado número de cópias, derivado de pUC, regulado por um promotor *trc*, resultante da fusão dos promotores *trp* e *lac*. Possui ainda um gene (*lacI^q*) que codifica para uma proteína repressora do gene *lac*, sendo a indução da expressão induzida pela adição de IPTG. O plasmídeo apresenta como marca de selecção a resistência à ampicilina. O vector codifica ainda para uma cauda de polihistidinas, de modo a facilitar a purificação da proteína recombinante.

Este sistema utiliza como hospedeiro a estirpe *E. coli* TOP10F', utilizada frequentemente na clonagem de fragmentos de DNA.

O vector de expressão pET-26b(+) é um vector de baixo número de cópias derivado de pBR322, com resistência à canamicina. Este vector contém um segmento promotor *T7lac* constituído pelo gene *lacI* seguido de uma sequência promotora *T7*, que é, por sua vez, seguida por uma sequência operadora *lac* (Studier e Moffatt, 1986). A estirpe hospedeira de expressão, *E. coli* BL21(DE3), é uma estirpe lisogenizada com o bacteriófago ϕ DE3, contendo sequências que codificam para a RNA polimerase *T7* sob controlo do promotor *lacUV5* (Studier *et al.*, 1990). Na ausência de IPTG o repressor *lac* inibe a síntese de RNA polimerase, e a síntese de proteína recombinante, pela ligação ao operador *lac* situado a montante. Quando a estirpe hospedeira portadora do vector é exposta ao IPTG, a RNA polimerase *T7* é sintetizada pelo hospedeiro e inicia a produção de RNA mensageiro do gene clonado no vector. A célula hospedeira *E. coli* BL21(DE3), apresenta a vantagem adicional de não possuir as proteases *lon* e *ompT*, que em células normais contribuem para a degradação de polipéptidos endógenos e exógenos (Studier *et al.*, 1990). Tal como o anterior, o vector pET-26b(+) codifica para uma cauda de seis histidinas.

4.1.2. Clonagem do gene *bla_{SFC-1}*

Para a clonagem utilizando o sistema pTrcHis, o gene *bla_{SFC-1}* foi amplificado por PCR, a partir do DNA total da estirpe de *S. fonticola* UTAD54, utilizando os primers SfcF e SfcR2, desenhados com base na sequência do gene.

SfcF: 5'-GAT CTC GAG AAT GTC ACG CAC CGG TCG ACT G-3' (Henriques, 2000)

SfcR2: 5'-GAT AGA TCT TTA GAA GCC GAT AGA CTT TCC-3'

O fragmento obtido, apresentando o tamanho esperado, foi digerido pelas endonucleases de restrição *XhoI* e *BglII* e ligado ao vector pTrcHis, também digerido com as mesmas enzimas. O gene *bla_{SFC-1}* foi inserido em fase com a sequência codificante para uma cauda de histidinas C-terminal de modo a permitir a purificação por cromatografia de afinidade em metal imobilizado (IMAC). Deste modo, o produto de tradução resultante é uma proteína de fusão. Após transformação em células competentes de *E. coli* TOP10F', foi possível seleccionar, em placas de LB

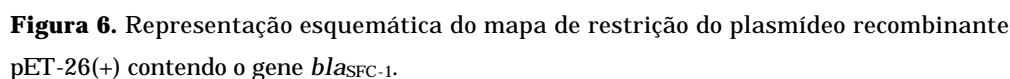
suplementado com IPTG (40 µl), ampicilina (50 µg/ml) e aztreonamo (5 µg/ml), transformantes resistentes ao aztreonamo. Cinco dos clones resistentes foram analisados por PCR. Dois deles foram repicados para novas placas de selecção (meio de LB suplementado com 50 µg/ml de ampicilina e 5 µg/ml de aztreonamo). A extracção de plasmídeos recombinantes efectuou-se pelo método descrito no ponto 3.7.2 (Material e Métodos). A construção foi verificada por análise de restrição, e determinação da sequência nucleotídica, para confirmar que a fase de leitura adequada foi obtida e que não foram introduzidos erros por PCR.

Para a clonagem de *bla*_{SFC-1} no vector pET-26b(+) usou-se um procedimento semelhante ao descrito anteriormente. O vector pET-26b(+) codifica para uma cauda peptídica de 6 histidinas com função na purificação, quando fundida com a proteína alvo. Apesar da vantagem aparente na purificação, estas caudas apresentam algumas desvantagens: primeiro, a necessidade de proteases dispendiosas para libertar a proteína alvo; segundo, a clivagem raramente é completa conduzindo a uma diminuição do rendimento; terceiro, podem ser necessários passos adicionais para obter um produto activo; e finalmente, porque não há garantia da solubilidade do produto final (Baneyx, 1999). Assim, foram desenhados *primers* com base na sequência nucleotídica do gene e do vector, de modo a que o gene fosse transcrito sem a cauda de histidinas codificada pelo vector. Os *primers* utilizados foram:

SFCexp2_for: 5'-GGA TCC ACA TGT CAC GCA CCG GTC GAC TG-3'

SFCexp2_rev: 5'-GTG CTC GAG TTA GAA GCC GAT AGA CTT TCC-3'

O *primer* directo contém um local de restrição *Bsp**Lu*11I (sublinhado) para gerar um local de restrição compatível com *Nco*I e um codão de iniciação ATG. O *primer* reverso possui um local de restrição *Xho*I (sublinhado), presente também no vector pET-26b(+). O fragmento amplificado, digerido com *Bsp**Lu*11I e *Xho*I, foi ligado no vector (digerido com *Nco*I e *Xho*I) no local *Nco*I, correspondente ao início de tradução, e no local *Xho*I 3' (Fig. 6). O inserto foi introduzido com o codão *stop* da sequência e portanto o produto de tradução resultante é a enzima SFC-1 e não uma proteína de fusão.



4.2. Caracterização do fenótipo de resistência conferido pela enzima SFC-1

58

Os resultados permitem confirmar que a enzima SFC-A, cujo gene foi clonado no plasmídeo pMF13, confere resistência às penicilinas amoxicilina e ticarcilina, ao aztreonamo e aos carbapenemos imipenemo e meropenemo. De salientar ainda que esta enzima é inibida pelos inibidores de β -lactamases de classe A, ácido clavulânico e tazobactam. Verifica-se que a actividade sobre a amoxicilina é inibida pelo ácido clavulânico, o que se traduz numa diminuição da concentração mínima inibitória deste antibiótico de > 256 para $4 \mu\text{g/ml}$. O mesmo efeito é causado pelo tazobactam relativamente à piperacilina verificando-se uma redução da concentração mínima inibitória de > 256 para $2 \mu\text{g/ml}$ na presença deste inibidor.

Os resultados do cálculo das concentrações mínimas inibitórias para o aztreonamo revelam uma maior actividade da β -lactamase SFC-A na estirpe de *E. coli* transformada relativamente à estirpe original, verificando-se um aumento da concentração mínima inibitória de $16 \mu\text{g/ml}$ na estirpe *S. fonticola* UTAD54 para $>256 \mu\text{g/ml}$ na estirpe de *E. coli* transformada. Esta diferença poderá ser atribuída a uma maior produção de enzima em *E. coli*, devido à presença de um maior número de cópias do gene correspondente, uma vez que o plasmídeo utilizado possui 20 a 60 cópias por célula. Um efeito semelhante foi anteriormente descrito (Naas *et al.*, 1994).

Tabela 6. Valores das MICs *Minimal Inhibitory Concentrations*) determinados para as estirpes *S. fonticola* UTAD54, *S. fonticola* LMG7882^T, *E. coli* pMF13 e *E. coli* BL21(DE3).

| Antibiótico(s) ^a | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| | <i>S. fonticola</i> | <i>S. fonticola</i> | <i>E. coli</i> BL21(DE3) | <i>E. coli</i> BL21(DE3) |
| | LMG7882 ^T | UTAD54 | (pMF13) | |
| Amoxicilina | 48 (R) | >256 (R) | >256 (R) | 1 (S) |
| Amoxicilina-CLA | 1,5 (S) | 16 (R) | 4 (S) | 1 (S) |
| Piperacilina | 1 (S) | >256 (R) | >256 (R) | 0,5 (S) |
| Piperacilina-TZB | 0,25 (S) | 0,38 (S) | 2 (S) | 0,38 (S) |
| Ticarcilina-CLA | 1 (S) | >256 (R) | 12 (S) | ND ^b |
| Cefoxitina | 6 (S) | 16 (I) | 1,5 (S) | 1,5 (S) |
| Ceftazidima | 0,064 (S) | 0,25 (S) | 0,094 (S) | 0,047 (S) |
| Cefotaxima | 0,5 (S) | 2 (S) | 0,25 (S) | $<0,016$ (S) |
| Cefepima | 0,047 (S) | 6 (S) | 0,094 (S) | 0,23 (S) |
| Aztreonamo | 0,19 (S) | 16/1,5 (I) | >256 (R) | $<0,016$ (S) |
| Imipenemo | 0,25 (S) | >32 (R) | >32 (R) | 0,125 (S) |
| Meropenemo | 0,032 (S) | >32 (R) | $>32/ 1,5$ (R?) | ND |

^a CLA – Ácido clavulânico; TZB – Tazobactam. ^b ND – Não determinado.
R – resistente; S – sensível; I – intermédia.

Em relação à piperacilina, aztreonamo, imipenemo e meropenemo verifica-se que os valores das concentrações mínimas inibitórias calculados para a estirpe de *E. coli* transformada com o plasmídeo pMF13 são superiores relativamente aos valores publicados para a clonagem do mesmo gene (Henriques *et al.*, 2004). Este facto deve-se possivelmente a uma maior produção da enzima SFC-1 na estirpe *E. coli* BL21(DE3)(pMF13), resultante da sobreexpressão do gene *bla*_{SFC-1}.

O perfil de substratos e de inibidores apresentado é característico das enzimas incluídas no subgrupo 2f (carbapenemases de classe A), segundo a classificação de Bush (Bush *et al.*, 1995). No geral, estas enzimas hidrolisam eficientemente as penicilinas, cefalosporinas de 1ª geração, aztreonamo e carbapenemos, e a sua actividade é inibida pelo ácido clavulânico e tazobactam (Rasmussen *et al.*, 1997). No entanto, os valores das concentrações mínimas inibitórias determinados para as cefalosporinas são inferiores aos calculados para as restantes carbapenemases de classe A caracterizadas até ao momento (Rasmussen *et al.*, 1996; Yigit *et al.*, 2001; Yigit *et al.*, 2003; Woodford *et al.*, 2005), excepto para a cefotaxima cujo valor é idêntico ao das enzimas NMC-A (Nordmann *et al.*, 1993) e Sme-1 (Naas *et al.*, 1994).

Em relação ao aztreonamo, o clone *E. coli* BL21(DE3)(pMF13) apresenta o valor de concentração mínima inibitória mais elevado, quando comparado com as carbapenemases de classe A já caracterizadas. O mesmo se observa relativamente ao meropenemo, em que o valor determinado, >32 µg/ml, apenas é comparável ao da enzima IMI-1, que confere um grau de resistência aos carbapenemos semelhante (Rasmussen *et al.*, 1996). Isto poderá dever-se, mais uma vez, à sobreexpressão da SFC-1 no clone *E. coli* BL21(DE3)(pMF13).

4.3. Detecção da actividade enzimática

A actividade β-lactâmica pode ser analisada por detecção da degradação de compostos beta-lactâmicos utilizando métodos baseados em reacções cromogénicas ou métodos espectrofotométricos (Lucas, 1979; Sykes e Matthew, 1979).

Os métodos cromogénicos são mais rápidos e cómodos e podem ser divididos em dois tipos: aqueles em que a hidrólise do anel β-lactâmico produz imediatamente alteração de cor, e aqueles cuja alteração depende de uma segunda reacção. No primeiro grupo encontra-se a utilização do composto nitrocefina (O'Callaghan *et al.*,

1972) que muda de amarelo para rosa/vermelho após hidrólise. Este método, apesar de dispendioso, é muito sensível à maioria das β -lactamases.

Os sistemas de detecção dependentes de uma reacção encadeada incluem os métodos iodométrico e acidimétrico. O primeiro relaciona-se com a capacidade dos produtos de hidrólise dos compostos β -lactâmicos reduzirem iodo a iodeto: a descoloração do complexo amido-iodo ocorre apenas se um isolado é produtor de β -lactamase(s) (Sykes e Matthew, 1979). Os testes acidimétricos tiram partido do facto do anel β -lactâmico aberto gerar um carboxilo livre, cuja acidez consegue alterar o bromocresol púrpura de violeta a amarelo, num sistema não tamponado (Sykes e Matthew, 1979). Os testes acidimétricos e iodométricos podem ser realizados com suspensões bacterianas ou em tiras de papel impregnadas com os reagentes apropriados. Estes métodos são menos dispendiosos que o nitrocefim e quase tão sensíveis, mas são mais susceptíveis à obtenção de resultados falsos-positivo (Livermore, 1995).

A detecção da hidrólise do antibiótico pode também ser efectuada no espectrofotómetro, por monitorização da variação de absorvância a determinado comprimento de onda, dependendo do substrato a testar. Do ponto de vista da sensibilidade, este método é preferível aos métodos acidimétricos e iodométricos (Samuni, 1975; Waley, 1974). Os ensaios espectrofotométricos permitem o estudo de concentrações de antibióticos muito baixas, 1 a 10 μ M (Vu e Nikaido, 1985), permitindo estudar uma gama mais extensa de concentrações de substrato.

Neste trabalho a actividade β -lactâmica foi detectada utilizando uma solução da cefalosporina cromogénica nitrocefim sobre géis SDS-PAGE, e pela hidrólise do aztreonamo através da monitorização da perda de absorvância a 318 nm ($\epsilon_{318} = -640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Foi escolhido o aztreonamo como substrato de quantificação da actividade da enzima SFC-1, por ser o único substrato não hidrolisável pelas restantes β -lactamases produzidas pela estirpe *S. fonticola* UTAD54, utilizada como controlo positivo nos ensaios de actividade.

A separação de β -lactamases por SDS-PAGE permite uma estimativa do peso molecular das enzimas expressas (Stock *et al.*, 2003). Os extractos brutos das estirpes *S. fonticola* UTAD54, *S. fonticola* 7882, *E. coli* TOP10F'/pTrc5 e *E. coli* BL21(DE3)/pMF13 foram separados por SDS-PAGE e renaturados com uma solução Triton X-100, de acordo com a metodologia descrita no ponto 3.13.2 do Material e

Métodos. A coloração com nitrocefin permitiu detectar a presença de actividade β -lactâmica nos extractos testados.

No extracto *E. coli* TOP10F'/pTrc5 foram reveladas duas bandas com peso molecular semelhante, que correspondem à β -lactamase TEM-1 cujo gene se encontra codificado no plasmídeo utilizado e confere resistência à ampicilina, e à enzima SFC-1 codificada pelo inserto introduzido no plasmídeo. A estirpe *E. coli* BL21(DE3)/pMF13 apresentou apenas uma banda com actividade, com um peso molecular de aproximadamente 30,5 kDa. Este resultado aproxima-se do valor 30,7 estimado com base na sequência de aminoácidos da enzima SFC-1 (Henriques, 2001). Em cada um dos extractos das estirpes *S. fonticola* UTAD54 e *S. fonticola* 7882 foi detectada apenas uma banda com actividade β -lactâmica. Contudo, tendo em conta os dados disponíveis sobre a presença de β -lactamases em *S. fonticola* (Henriques, 2001; Stock *et al.*, 2003), esperaríamos a detecção de duas bandas. Este facto poderá ter origem na baixa expressão de uma das β -lactamases.

Este método revelou-se útil não só para a confirmação da expressão da enzima recombinante mas também para a identificação da banda correspondente em géis de SDS-PAGE.

Apesar da sua aplicação ao estudo da produção ou presença de β -lactamase(s), o método da separação de extractos por SDS-PAGE e coloração com o composto cromogénico nitrocefin, é um método que não permite a quantificação eficaz da actividade enzimática. Esta quantificação pode ser efectuada através da monitorização da variação da absorvância de um substrato, espectrofotometricamente. A partir dos dados obtidos é possível calcular a quantidade de substrato hidrolisado ao longo do tempo, como uma alteração da absorvância por minuto. Por análise de regressão linear obtém-se uma recta cujo declive representa a velocidade inicial (v_0). Considera-se que este valor é directamente proporcional à quantidade de enzima presente no ensaio, mantendo as restantes condições. Neste trabalho a quantificação de enzima activa, nas diferentes amostras, foi determinada através da monitorização da hidrólise do aztreonamo a 318 nm ($\epsilon = -640 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

O ensaio de actividade desenvolvido permitiu uma determinação exacta da actividade da SFC-1 produzida, bem como inferir sobre a sua solubilidade, nas diferentes condições de produção testadas.

4.4. Produção de SFC-1 em *E. coli*

4.4.1. Expressão em pTrcHis

O primeiro vector de expressão utilizado foi o vector pTrcHis, que contém o promotor *trc*. Para os estudos de expressão, foram utilizados pré-inóculos de um transformante isolado da estirpe *E. coli* TOP10F' para inocular meio fresco de LB com ampicilina. A cultura foi incubada a 37°C. A uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,6, as células foram induzidas com IPTG, numa concentração final de 1 mM. As células foram depois recolhidas e lisadas por sonicação, como descrito no ponto 3.13.1 do Material e Métodos. As condições de cultura das células foram optimizadas, de modo a aumentar a produção de enzima activa. A duração da indução variou de 1h até 24h. A melhor expressão foi obtida entre 3 e 5h (Fig. 7C), atingindo um máximo de 41,93 µM/min/ml de cultura. Nos sedimentos celulares obtidos de culturas crescidas durante 18 horas foi detectada uma menor quantidade de enzima, possivelmente devido à sua degradação.

A produção bem sucedida de uma proteína recombinante em *E. coli* está dependente de vários parâmetros importantes. Estes incluem eficiência da transcrição e tradução, estabilidade do vector de expressão e do RNA mensageiro transcrito; localização, estabilidade e enrolamento correcto da proteína; bem como o crescimento celular (Makrides, 1996; Baneyx, 1999). Tal como anteriormente referido, utilizou-se neste sistema de expressão um vector de elevado número de cópias derivado de pUC. Este tipo de vectores apresenta como vantagem a elevada estabilidade aquando da partição aleatória que ocorre durante a divisão celular. Por outro lado, um elevado número de cópias de plasmídeos geralmente reduz a taxa de crescimento, permitindo que células com poucos plasmídeos dominem a cultura (Jonasson *et al.*, 2002). Este facto poderá, em parte, explicar que a produção de enzima recombinante tenha atingido um máximo depois de 5h de indução, e que a partir daí se tenha verificado uma diminuição progressiva.

Atendendo aos factores acima descritos, as condições da expressão foram posteriormente modificadas na tentativa de promover um aumento na expressão da enzima recombinante activa. A temperatura de expressão foi reduzida de 37°C para 30°C e 25°C, de modo a diminuir a velocidade da síntese da proteína de fusão, que poderia estar a obstruir os locais de exportação presentes na membrana interna.

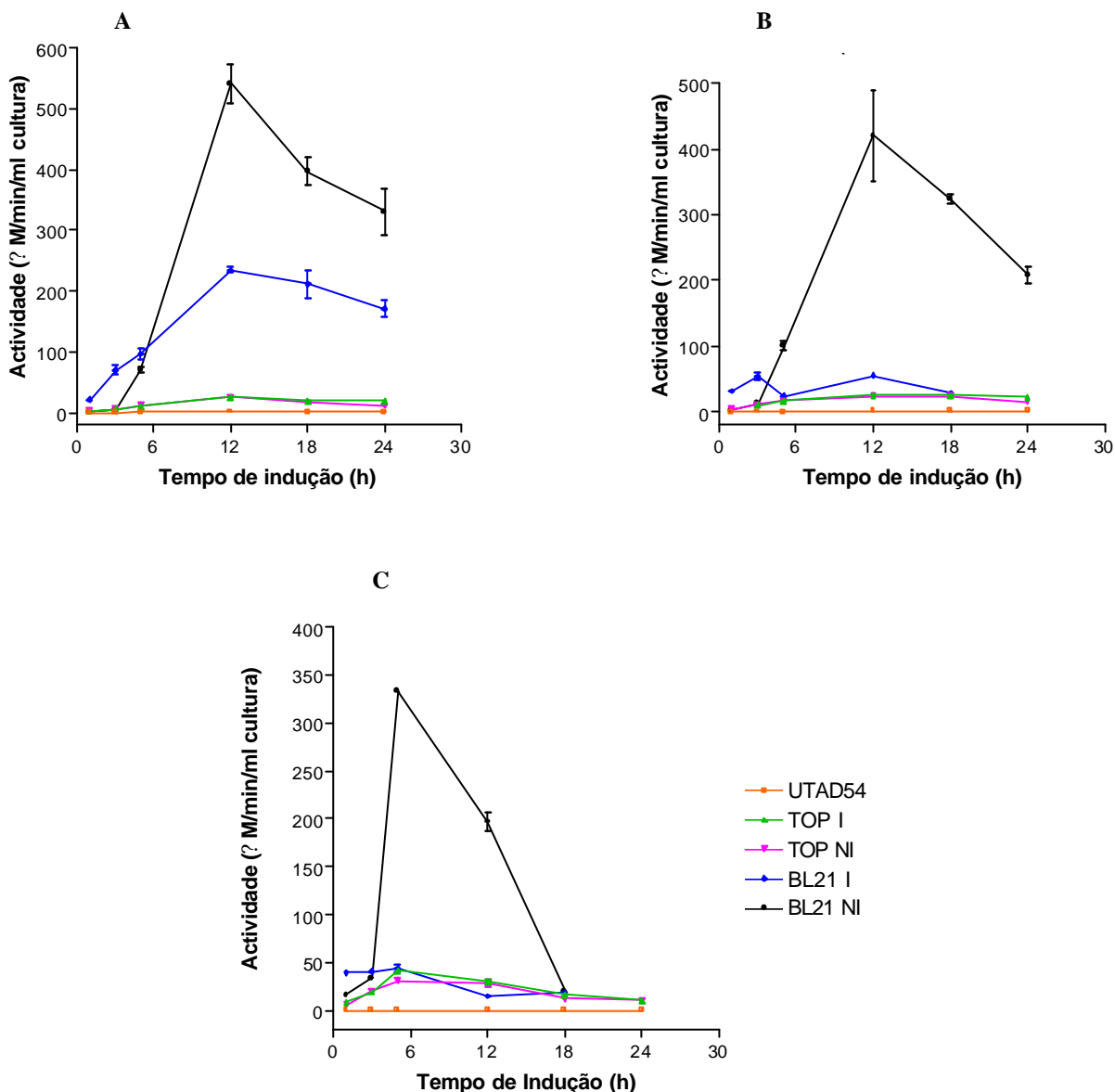


Figura 7. Produção da SFC-1 nas diferentes temperaturas testadas, para os dois sistemas de expressão. A – expressão a 25°C; B – expressão a 30°C; C – expressão a 37°C. TOP I: extracto TOP10F'/pTrc5 induzido; TOP NI: extracto TOP10F'/pTrc5 não induzido; BL21 I: extracto BL21(DE3)/pMF13 induzido; BL21 NI: extracto BL21(DE3)/pMF13 não induzido.

Verificou-se, no entanto, uma diminuição considerável da expressão proteica, atingindo-se valores máximos de 25,86 e 24,96 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ para culturas induzidas a 25°C e 30°C, respectivamente (Fig.7A e B). Estes valores foram obtidos após 12h de indução. De um modo geral, observou-se que a diminuição da temperatura provocou uma redução de produtividade, provavelmente relacionada com a taxa de crescimento.

Depois de produzida, uma proteína recombinante pode acumular-se numa forma solúvel no citoplasma, precipitar e formar agregados insolúveis conhecidos

como corpos de inclusão, ou estar parcialmente na forma de corpos de inclusão e parcialmente na forma solúvel (Jonasson *et al.*, 2002). Alternativamente, há a possibilidade do produto do gene ser secretado para o periplasma. A expressão periplásmica apresenta como vantagens favorecer a formação de pontes dissulfeto e para além disso, o periplasma possui um número reduzido de proteases comparativamente ao citoplasma (Baneyx e Mujacic, 2004). Os genes das β -lactamases produzidas por microrganismos Gram-negativos possuem uma sequência sinal para exportação para o periplasma, onde o péptido sinal é clivado, originando a forma activa da enzima (Bush e Miller, 1998). Deste modo, depois de produzida, a enzima SFC-1 é exportada para o periplasma.

Uma explicação possível para a reduzida produção de enzima recombinante activa com este sistema é a acumulação da proteína em agregados insolúveis. Um procedimento comum para minimizar a agregação de proteínas é a redução da temperatura de cultivo das células (Baneyx, 1999). No entanto, como já foi anteriormente descrito, a diminuição da temperatura de expressão do clone *E. coli* TOP10F'(pTrcHis5), conduziu a uma redução da quantidade de proteína activa para cerca de metade. Do mesmo modo, foi adicionado PMSF ao meio de cultura (a uma concentração final de 1mM), na tentativa de limitar a proteólise da proteína correctamente exportada para o periplasma. No entanto, não se verificou qualquer efeito positivo (Fig. 8).

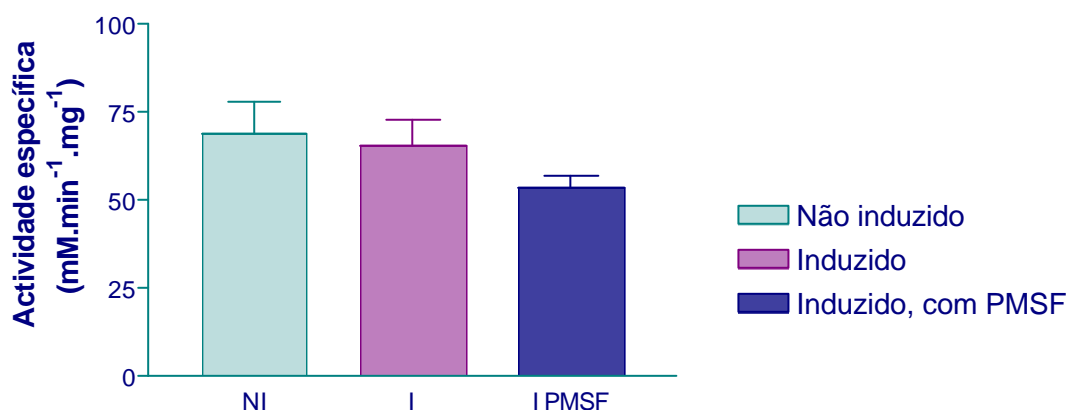


Figura 8. Actividade específica dos extractos brutos das culturas de *E. coli* TOP10F' induzida e não induzida, e induzida com PMSF. O crescimento das células foi efectuado a 37°C, e a indução decorreu durante 3 horas.

É de salientar ainda que, de um modo geral, não se observou qualquer efeito da indução pelo IPTG (Fig. 7 e 8). A maior diferença foi obtida a 37°C, para a actividade

do extracto recolhido após 5h de indução, com valores de 41,93 e 31,51 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ para as culturas induzida e não induzida, respectivamente. A expressão residual observada na cultura não induzida deve-se à utilização de um promotor indutível, regulado pelo repressor *lac*. Uma desvantagem deste tipo de promotores é que mantêm alguma actividade basal sob condições de não-indução (Jonasson *et al.*, 2002).

A produção da proteína recombinante atingiu um máximo de 41,93 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ de cultura, que é baixa em relação à produção de outras β -lactamases utilizando outros sistemas de expressão (Docquier *et al.*, 2002; Vessillier *et al.*, 2004). Embora este sistema de expressão possa constituir uma opção viável para a expressão e purificação de várias proteínas (Rossi *et al.*, 1997; Huerta-Saquero *et al.*, 2001; Bueschel *et al.*, 2003), não se mostrou adequado para produzir a enzima recombinante SFC-1 em quantidade, de modo a permitir a sua purificação.

4.4.2. Expressão em pET

A expressão da proteína recombinante utilizando o sistema pET foi obtida pela cultura de células *E. coli* BL21(DE3) portadoras do pMF13, de acordo com as condições já descritas para o sistema anterior. As condições de cultura das células hospedeiras foram optimizadas, variando a duração da indução de 1h até 24h, tal como no sistema anterior. Com este sistema, a melhor expressão a 37°C foi obtida entre 3 e 5h após indução (Fig. 7C), atingindo-se uma actividade de 43,49 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ para a cultura induzida. Nas horas seguintes, o crescimento foi mais lento, alcançando o máximo após 5h, quando pára a sobreprodução (Fig. 7C). Após 18h de indução, a síntese de SFC-1 é reduzida a 43% do valor máximo. Depois de uma expressão mais prolongada, as células não sobrevivem e são, possivelmente, lisadas (Christodoulou e Vorgias, 2002), pelo que é aconselhável realizar a expressão da síntese proteica durante intervalos mais pequenos, normalmente não mais do que 5h. Nos sedimentos celulares obtidos de culturas crescidas durante mais tempo, uma menor quantidade de proteína foi detectada, possivelmente também devido à degradação da proteína por proteases endógenas. Estes resultados estão de acordo com outros já publicados para a expressão de outras proteínas utilizando o sistema pET (Nelson e Creutz, 1995; Vessillier *et al.*, 2002).

O efeito da variação da temperatura de cultivo das células (25°C e 30°C) também foi testado, verificando-se um aumento significativo da síntese da proteína recombinante a temperaturas mais baixas (Fig. 7A e B). A quantidade de SFC-1

activa mais elevada foi obtida, para culturas induzidas, a 25°C com 12h de expressão, obtendo-se uma actividade de 234,38 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$. Isto traduziu-se num aumento de produção de 4,3 e 5,4 vezes relativamente à expressão a 30 e 37°C, respectivamente. A produção rápida de proteínas recombinantes pode conduzir à formação de agregados insolúveis, também designados corpos de inclusão, resultantes de um enrolamento deficiente da proteína (Schumann e Ferreira, 2004). Uma das técnicas conhecidas para promover o enrolamento correcto das proteínas é o crescimento dos microrganismos produtores a temperaturas mais baixas. Temperaturas mais baixas favorecem o estado nativo devido a vários factores, incluindo diminuição da força que conduz a auto-associação da proteína e diminuição da síntese proteica (Schumann e Ferreira, 2004). Deste modo, o aumento de produção de SFC-1 activa observado a 25°C (Fig. 7A) deve-se, provavelmente, à diminuição da agregação da proteína em corpos de inclusão.

Relativamente à indução com o IPTG, verificou-se que este composto afecta negativamente a produção da β -lactamase SFC-1. Durante as primeiras 3h de indução, a expressão da proteína recombinante é sempre mais elevada na cultura induzida (Fig. 7), confirmando a acção do indutor. No entanto, a maior produção da enzima recombinante foi obtida na cultura não induzida, a 25°C, após 12h de sobreexpressão (Fig. 9). Detectou-se, no extracto proteico correspondente, uma actividade de 541 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ que representa um aumento de produção de cerca de 2,3 vezes, relativamente ao valor máximo obtido na cultura induzida.

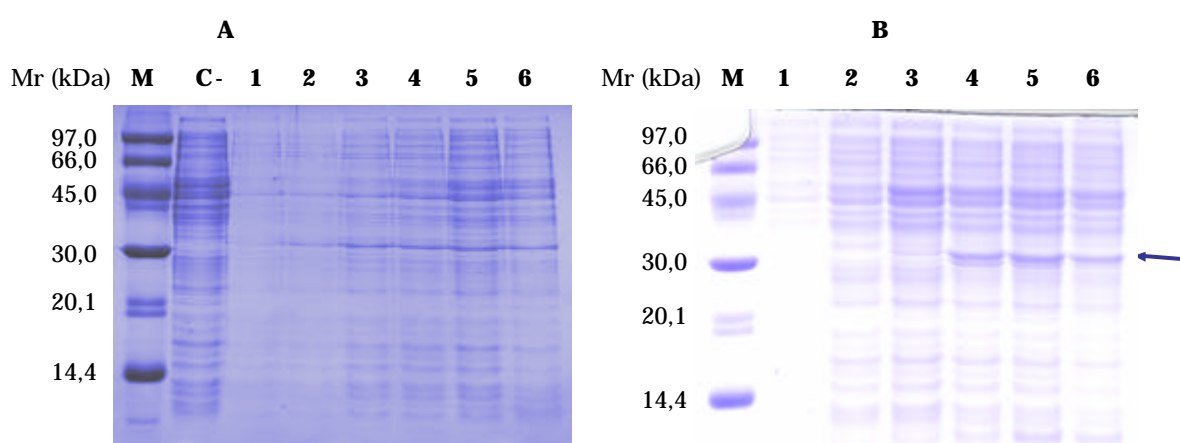


Figura 9. SDS-PAGE dos extractos da cultura de *E. coli* BL21(DE3)(pMF13) induzida (A) e não induzida (B) crescida a 25°C. M, marcador de peso molecular; C-, controlo negativo: *E. coli* BL21(DE3)(pET-26(+)); 2-6 duração da expressão: 1, 3, 5, 12, 18, e 24 horas respectivamente. A seta indica a proteína SFC-1.

Nas temperaturas de expressão mais elevadas, esta diferença é ainda mais evidente, com uma produção 7,7 vezes superior na cultura não induzida, a 30°C e 37°C.

Estudos realizados por Kosinski e colaboradores (1992) demonstraram que a indução do operador *lac* com IPTG afecta a taxa de crescimento de *E. coli*, verificando que concentrações de indutor superior a 0,05 mM podem ser inibitórias para o crescimento. Um trabalho sobre a regulação da expressão demonstrou que elevados níveis de produção proteica poderiam ser obtidos com alguns vectores pET e, em alguns casos, mais elevados do que aqueles observados após indução com IPTG (Kelley *et al.*, 1995). Este fenómeno registou-se em células no início da fase estacionária, provavelmente devido ao aumento da expressão residual do operão *lac* cromossomal, regulada, pelos menos parcialmente, pela disponibilidade de nutrientes (Grossmann *et al.*, 1998).

O sistema pET utiliza a RNA polimerase T7, altamente processativa, capaz de sintetizar uma grande quantidade de RNA mensageiro (Studier e Moffatt, 1986), conduzindo, em muitos casos, à acumulação da proteína desejada em concentrações elevadas (Baneyx, 1999). No entanto, níveis elevados de RNA mensageiro podem causar a destruição dos ribossomas e morte celular (Dong *et al.*, 1995). Adicionalmente, o promotor *lacUV5*, que conduz a expressão do gene da RNA polimerase T7, é conhecido por permitir um nível residual de transcrição em células não induzidas (Dubbendorf e Studier, 1991). Assim, é possível que a transcrição do gene *bla_{SFC-1}* em condições não induzidas se tenha efectuado mais lentamente, diminuindo a competição entre o RNA mensageiro da proteína recombinante e o das proteínas nativas pelos ribossomas e conduzindo a uma maior estabilidade do RNA ribossomal 16S. A redução da taxa da síntese proteica tem sido descrita como um dos factores responsáveis pela produção de uma maior quantidade de proteína solúvel, devido a uma atenuação na formação de corpos de inclusão (Jonasson *et al.*, 2002).

De salientar ainda que, como foi referido anteriormente, a maior produção de SFC-1 activa foi obtida em culturas não induzidas a 25°C, observando-se, deste modo, que é também favorecida pela diminuição da temperatura. A expressão da β -lactamase SFC-1 a 25°C foi 1,3 e 1,6 vezes superior àquela efectuada a 30 e 37°C, respectivamente.

Na cultura da estirpe *S. fonticola* UTAD54 a expressão da enzima SFC-1 foi detectada mas a um nível muito baixo, quando comparada com os sistemas de expressão, para as condições testadas. Isto pode dever-se ao facto desta estirpe apresentar uma cópia única do gene *bla*_{SFC-1} no cromossoma bacteriano, enquanto que nos sistemas de expressão este gene está presente em várias cópias (elevado número para pTrcHis e baixo número em pET).

A produção de enzima recombinante activa mais elevada foi alcançada utilizando o sistema pET, sendo cerca de 13 vezes superior em relação ao sistema TrcHis. Nelson e Creutz (1995) publicaram um resultado semelhante, depois da análise da expressão de uma proteína recombinante em *E. coli* utilizando quatro sistemas de expressão diferentes. Os resultados apresentados neste trabalho podem dever-se não só à utilização da RNA polimerase T7, e de um vector de baixo número de cópias, mas também à utilização da estirpe BL21(DE3). Estas células são portadoras de mutações na protease *lon* e na protease da membrana externa *ompT*, diminuindo eficientemente a degradação de proteínas heterólogas secretadas para o periplasma (Baneyx e Mujacic, 2004; Christodoulou e Vorgias, 2002).

O sistema formado pelo vector pET-26(+) e *E. coli* BL21(DE3)(pMF13) foi deste modo adoptado para a produção em “larga” escala da β -lactamase SFC-1 e posterior purificação.

4.5. Purificação da β -lactamase SFC-1

A produção da β -lactamase SFC-1 destinada à purificação, foi efectuada a partir da cultura não induzida de *E. coli* BL21(DE3)(pMF13). As células cresceram a 37°C com agitação até uma DO_{600} de 0,6. A sobreexpressão foi realizada a 25°C com agitação durante 12h. A preparação do extracto proteico foi efectuada de acordo com a metodologia descrita no ponto 3.13.1 do Material e Métodos.

O extracto filtrado foi aplicado a uma coluna de troca catiónica SP Sepharose™, com um gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl. A fracção com actividade de β -lactamase encontra-se assinalada com uma seta na figura 10, que mostra o perfil cromatográfico de troca catiónica obtido a 280nm. A análise por SDS-PAGE (Fig. 12) revela que esta fracção é composta maioritariamente por uma banda com um peso molecular aparente de 30,7 kDa, correspondente ao esperado para a enzima SFC-1.

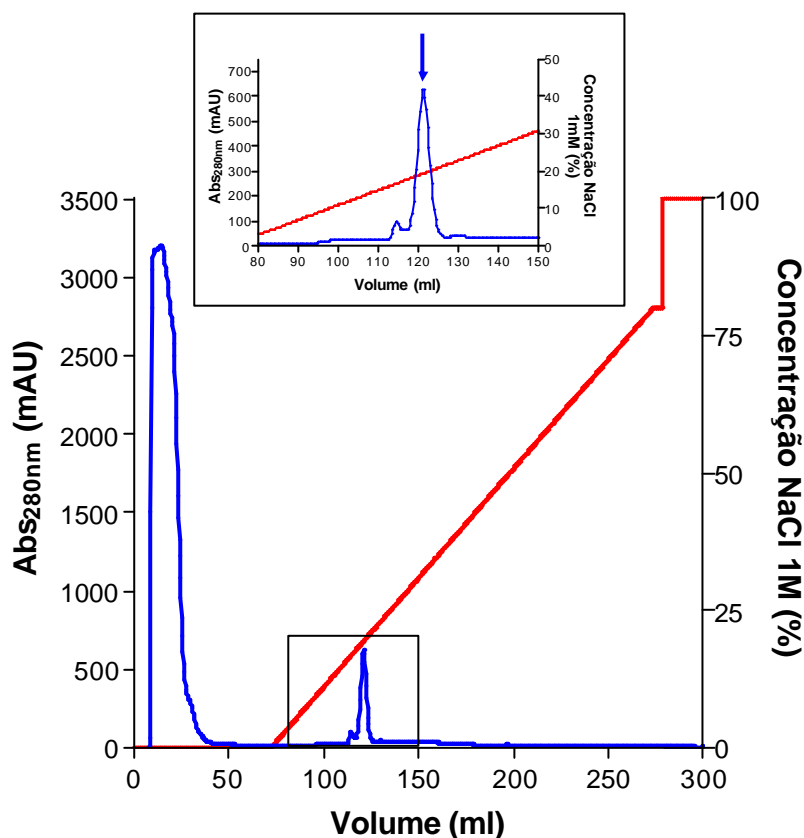


Figura 10. Perfil cromatográfico (a 280 nm) de um extracto da cultura de *E. coli* BL21(DE3) aplicado a uma coluna de troca actiónica SP Sepharose™. A eluição foi efectuada com um gradiente linear de NaCl (representado a vermelho). A seta indica a fracção com actividade β -lactâmica.

De seguida, a fracção activa recolhida da coluna de troca catiónica foi aplicada a uma coluna de exclusão molecular Superdex™ 75. O cromatograma, a 280nm, mostra a presença de apenas uma fracção proteica, com um pico aparentemente simétrico (Fig. 11).

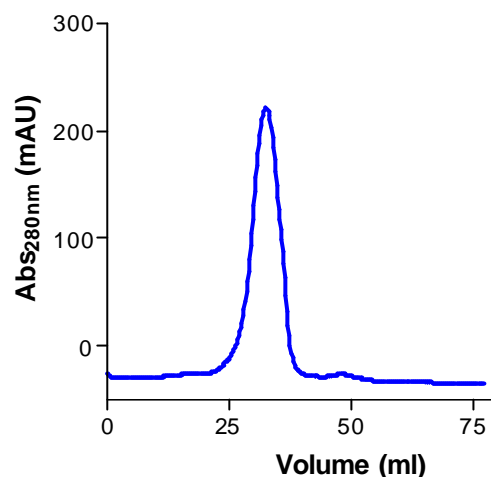


Figura 11. Perfil cromatográfico (a 280nm) da fracção assinalada na figura 10, aplicada a uma coluna de exclusão molecular Superdex™ 75. A eluição foi realizada com tampão fosfato de sódio 10 mM, a pH 6,0, a um fluxo de 1,0 ml/min.

O exame da amostra por SDS-PAGE (Fig. 12) confirmou a purificação da β -lactamase SFC-1 até à homogeneidade. A enzima pura apresenta um peso molecular aproximado de 30,7 kDa, que está de acordo com o valor estimado a partir da sequência nucleotídica (Henriques *et al.*, 2004).

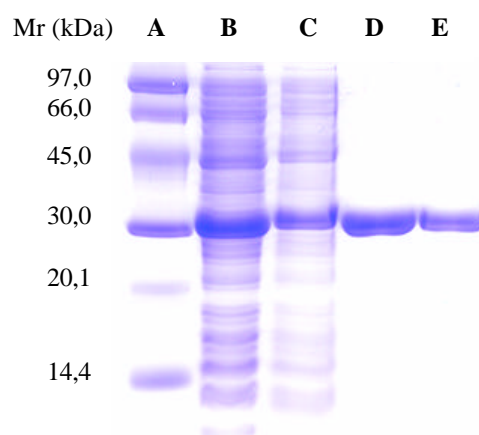


Figura 12. SDS-PAGE (corado com *coomassie brilliant blue*) da SFC-1 purificada a partir de *E. coli* BL21(DE3)(pMF13). A, marcador de peso molecular; B, extracto bruto da cultura de *E. coli* BL21(DE3)(pMF13); C, extracto diluído 10x; D, fracção da troca catiónica com actividade; E, SFC-1 purificada.

A amostra foi de imediato sujeita a diálise, contra água ultra pura, para a remoção de sais. A diálise decorreu como descrito no ponto 3.15.1 do Material e Métodos.

A tabela 7 resume o processo de purificação da SFC-1 até à homogeneidade proteica. Após o primeiro passo de purificação obteve-se uma actividade específica da enzima cerca de 2,7 superior relativamente ao extracto bruto, e uma perda de proteína de 13% da actividade total inicial. No entanto, após purificação com a coluna Superdex 75 e diálise obteve-se uma redução de actividade específica da enzima na ordem dos 34%, contrariamente ao que seria esperado. Possivelmente, isto deve-se a uma inactivação parcial da enzima durante o processo de diálise. Durante a purificação da metalo- β -lactamase BlaB, Vessilier e colaboradores (2002) descreveram um efeito semelhante.

Tabela 7. Resumo do procedimento de purificação de β -lactamase SFC-1.

| Passo de purificação | Actividade (mM min ⁻¹ ml ⁻¹) | Proteína (mg/ml) | Actividade específica (mM min ⁻¹ mg ⁻¹) | Rendimento (%) |
|----------------------|--|---------------------|--|-------------------|
| Extracto | 12,89 | 4,6076 | 2,80 | 100,00 |
| SP-Sepharose | 6,72 | 0,8877 | 7,57 | 86,87 |
| Superdex 75 | 4,22 | 0,8456 | 4,99 | 61,09 |

5. CONCLUSÕES

1. O sistema de expressão constituído por pTrcHis e *E. coli* TOP10F' mostrou não ser o apropriado para a sobreexpressão da enzima SFC-1.
2. Por sua vez, o sistema de expressão formado pelo vector pET-26(+) e *E. coli* BL21(DE3)(pMF13) foi extremamente eficiente para a produção da β -lactamase SFC-1.
3. A expressão da proteína SFC-1 atingiu o máximo em culturas não induzidas, à temperatura de 25°C e ao fim de 12 horas.
4. O sistema pET revelou-se ideal para a obtenção de uma elevada quantidade de proteína recombinante, possibilitando estabelecer um protocolo de purificação.
5. O procedimento apresentado nesta dissertação permitiu a purificação da β -lactamase SFC-1 até à homogeneidade. A enzima pura apresenta um peso molecular de aproximadamente 30,7 kDa.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o protocolo de purificação apresentado neste trabalho é possível obter a β -lactamase SFC-1 suficientemente pura para a caracterização bioquímica da enzima. Esta caracterização será efectuada através da determinação dos parâmetros cinéticos e das condições óptimas de actividade e estabilidade da enzima.

A quantidade de enzima pura obtida permite ainda a realização de estudos estruturais futuros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, E. P., e E. Chain.** 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. **146**:837.
- Ambler, R. P.** 1980. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* **289**:321–331.
- Ambler, R. P., A. F. W. Coulson, J.-M. Frère, J. M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Lévesque, J. Tiraby, e S. G. Waley.** 1991. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem. J.* **276**:269-270.
- Antignac, A., I. G. Boneca, J. C. Rousselle, A. Namane, J. P. Carlier, e J. A. Vazquez.** 2003. Correlation between alterations of the penicillin-binding protein 2 and modifications of the peptidoglycan structure in *Neisseria meningitidis* with reduced susceptibility to penicillin G. *J. Biol. Chem.* **278**:31529–31535.
- Arakawa, Y., M. Murakami, K. Susuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato, e M. Ohta.** 1995. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1612-1615.
- Baneyx, F.** 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**:411–421.
- Baneyx, F., e M. Mujacic.** 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotech.* **22**:1399-1408.
- Bollet, C., M. Gainnier, J. M. Sainty, P. Orbesser, e P. De Micco.** 1991. *Serratia fonticola* isolated from a leg abscess. *J Clin Microbiol.* **29**:834–835.
- Bonner G., E. M. Lafer, e R. Sousa.** 1994. Characterization of a set of T7 RNA polymerase active site mutants. *J. Biol. Chem.* **269**:25120–25128.
- Bonnet, R., H. Marchandin, C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, C. De Champs, E. Jumas-Bilak, e J. Sirot.** 2002. Chromosome-encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2004–2006.
- Bradford, P. A.** 2001. What's New in β -lactamases?. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **3**:13-19.
- Brock, T. D., M. T. Madigan, J. M. Martinko, e J. Parker.** 1994. *Biology of Microorganisms*. 7^a ed. Prentice-Hall. London.
- Bueschel, D. M., B. H. Jost, S. J. Billington, H. T. Trinh, e J. G. Songer.** 2003. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet. Microbiol.* **94**:121–129.
- Bush, K, G. Jacoby, e A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1211-1233.
- Bush, K.** 1989. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:259-263.

- Bush, K.** 1998. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin. Infect. Dis.* **27**:S48-S53.
- Bush, K.** 1999. β -Lactamases of increasing clinical importance. *Curr. Pharm. Design.* **5**:839-845.
- Bush, K.** 2001. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infec. Dis.* **32**:1085-1089.
- Bush, K.** 2002. The impact of β -lactamases on the development of novel antimicrobial agents. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **3**:1284-1290.
- Bush, K., e G. Miller.** 1998. Bacterial enzymatic resistance: β -lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:509-515.
- Bush, K., e R. B. Sykes.** 1986. Methodology for the study of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **30**:6-10.
- Bush, K., e S. Mobashery.** 1998. How β -lactamases have driven pharmaceutical drug discovery. Resolving the Antibiotic paradox 71-98. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Chamberlin, M., J. McGrath, e L. Waskell.** 1970. New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Nature.* **228**:227-231.
- Christensen, H., M. T. Martin, e S. G. Waley.** 1990. Beta-lactamases as fully efficient enzymes. Determination of all the rate constants in the acyl-enzyme mechanism. *Biochem. J.* **266**:853-861.
- Christodoulou, E., e C. E. Vorgias.** 2002. Understanding heterologous protein overproduction under the T7 promotor. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **30**:189-191.
- Dabernat, H., C. Delmas, M. Seguy, R. Pelissier, G. Faucon, e S. Bennamani.** 2002. Diversity of β -lactam resistance conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2208-2218.
- Davies, J.** 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science.* **264**:375-382.
- de Lancastre, H., B. L. M. de Jonge, P. M. Matthews, e A. Tomasz.** 1994. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**:7-24.
- Demain, A. L., e R. P. Elander.** 1999. The β -lactam antibiotics: past, present and future. *Ant. van Leeuwenhoek.* **75**:5-19.
- Dever, L., e T. Dermody.** 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch. Intern. Med.* **151**:886-895.

- Docquier, J.-D., T. Lopizzo, S. Liberatori, M. Prenna, M. C. Thaller, J.-M. Frere, e G. M. Rossolini.** 2004. Biochemical characterization of the THIN-B metallo- β -lactamase of *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4778-4783.
- Dong, H., L. Nilsson, e C. G. Kurland.** 1995. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J. Bacteriol.* **177**:1497-1504.
- Dubendorff, J. W., e F. W. Studier.** 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *J. Mol. Biol.* **219**:45-59.
- Fernandez-Cuenca, F., L. Martinez-Martinez, M. C. Conejo, J. A. Ayala, e E. J. Perea.** 2003. Relationship between β -lactamase production, outer membrane protein and penicillin binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:565-574.
- Fisher, J., J. G. Belasco, S. Khosla, e J. R. Knowles.** 1980. Beta-lactamase proceeds via an acyl-enzyme intermediate. Interaction of the *Escherichia coli* RTEM enzyme with cefoxitin. *Biochemistry.* **19**:2895-2901.
- Frère, J. M.** 1995. Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.* **16**:385-395.
- Frère, J. M., B. Joris, B. Granier, A. Matagne, F. Jacob, e C. Bourguignon-Bellefroid.** Diversity of the mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. 1991. *Res. Microbiol.* **142**:705-710.
- Galleni, M., J. Lamotte-Brasseur, G. M. Rossolini, J. Spencer, O. Dideberg, e J. M. Frère.** 2001. Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:660-663.
- Gavini, F., C. Ferragut, D. Izard, P. A. Trinel, H. Leclerc, B. Lefebvre, e D. A. Mossel.** 1979. *Serratia fonticola*, a new species from water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29**:92-101.
- Georgopapadakou, N. H.** 1993. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2045-2053.
- Gerrits, M. M., D. Schuijffel, A. A. van Zwet, E. J. Kuipers, C. M. Vandenbroucke-Grauls, e J. G. Kusters.** 2002. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to β -lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2229-2233.
- Ghuysen, J. M.** 1997. Penicillin-binding proteins. Wall peptidoglycan assembly and resistance to penicillin: facts, doubts and hopes. *J. Int. Antimicrobial Agents.* **8**:45-60.
- Gotoh, N., K. Nunomura, e T. Nishino.** 1990. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to cefsulodin: modification of penicillin-binding protein 3 and mapping of its chromosomal gene. *J. Antimicrob. Chemother.* **25**:513-523.

- Grimont, P. A. D., e F. Grimont.** 1984. Genus *Serratia*, p. 477-484. In N. R. Krieg e J. G. Holt (ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Grossmann, T. H., E. S. Kawasaki, S. R. Punreddy, e M. S. Osborne.** 1998. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. **209**:95-103.
- Guillaume, G., M. Vanhove, J. Lamotte-Brasseur, P. Ledent, M. Jamin, B. Joris, e J. M. Frère.** 1997. Site-directed mutagenesis of glutamate 166 in two β -lactamases. Kinetic and molecular modeling studies. *J. Biol. Chem.* **272**:5438-5444.
- Hawkey, P. M.** 2000. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Intensive Care Med.* **26**:S9-S13.
- Henriques, I.** 2001. Caracterização de β -lactamases em *Serratia fonticola*. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro.
- Henriques, I., A. Moura, A. Alves, M. J. Saavedra, e A. Correia.** 2004. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolysing class A β -lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2321-2324.
- Hernandez-Alles, S., V. J. Benedi, L. Martinez-Martinez, A. Pascual, A. Aguilar, J. M. Tomas, e S. Alberti.** 1999. Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:937-939.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, e S. T. Williams** (ed). 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9ª ed. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Huerta-Saquero, A., J. Calderon, R. Arreguin, A. Calderon-Flores, e S. Duran.** 2001. Overexpression and purification of *Rhizobium etli* glutaminase A by recombinant and conventional procedures. *Protein Expr. Purif.* **21**:432-7.
- Huovinen, P., S. Huovinen, e G. A. Jacoby.** 1988. Sequence of PSE-2 β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:134-136.
- Jaurin, B., e T. Grundstrom.** 1981. *amp C* cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:4897-4901.
- Jonasson, P., S. Liljeqvist, P.-Å Nygren, e S. Ståhl.** 2002. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **35**:91-105.
- Kelley, K. C., K. J. Huestis, D. A. Austen, C. T. Sanderson, M. A. Donoghue, S. K. Stickel, E. S. Kawasaki, e M. S. Osburne.** 1995. Regulation of sCD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*. *Gene*. **156**:33-36.

- Knox, J. R.** 1995. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2593-2601.
- Knox, J. R., e P. C. Moews.** 1991. Beta-lactamase of *Bacillus licheniformis* 749/C. Refinement at 2 Å resolution and analysis of hydration. *J. Mol. Biol.* **220**:435-455.
- Köhler, T., J. C. Pechère, e P. Plésiat.** 1999. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**:771-778.
- Kosinski, M. J., U. Rinas, e J. E. Bailey.** 1992. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:782-784.
- Kotra, L., e S. Mobashery.** 1999. Mechanistic and clinical aspects of β -lactam antibiotics and β -lactamases. *Arch. Immunol. Ther. Ex.* **47**:211-266.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Lamotte-Brasseur J., F. Jacob-Dubuisson, G. Dive, J. M. Frère, e J.-M. Ghuysen.** 1992. *Streptomyces albus* G serine β -lactamase. Probing of the catalytic mechanism via molecular modelling of mutant enzymes. *Biochem. J.* **282**:189-195.
- Lamotte-Brasseur J., G. Dive, O. Dideberg, P. Charlier, J. M. Frère, e J. M. Ghuysen.** 1991. Mechanism of acyl transfer by the class A serine β -lactamase of *Streptomyces albus*. *G. Biochem. J.* **279**:213-221.
- Lauretti, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, e G.M. Rossolini.** 1999. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1584-159.
- Livermore, D. M.** 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:557-584.
- Livermore, D. M.** 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* **34**:634-640.
- Livermore, D. M., e N. Woodford.** 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:489-495.
- Livermore, D. M.** 1997. Acquired carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:673-676.
- Livermore, D. M.** 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:247-250.
- Lopez-Otsoa, F., L. Gallego, K. J. Towner, L. Tysall, N. Woodford, e D. M. Livermore.** 2002. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among

Acinetobacter baumannii isolates from a hospital in northern Spain. J. Clin. Microbiol. **40**:4741–4743.

Lucas, T. J. 1979. An evaluation of 12 methods for the demonstration of penicillinase. J. Clin. Pathol. **32**:1061–1065.

Majiduddin, F. K., I. C. Materon, e T. G. Palzkill. 2002. Molecular analysis of β -lactamase structure and function. Int. J. Med. Microbiol. **292**:127–137.

Makrides, S. C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. **60**:512–538.

Mariotte-Boyer S, M. H. Nicolas-Chanoine, e R. Labia. 1996. A kinetic study of NMC-A β -lactamase, an Ambler class A carbapenemase also hydrolyzing cephamycins. FEMS Microbiol Lett. **143**:29-33.

Markham, P. N., e A. A. Neyfakh. 2001. Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. Curr. Opin. Microbiol. **4**:509-514.

Massova, I., e S. Mobashery. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. **42**:1-17.

Mata, M. T., F. Baquero, e J. C. Perez-Diaz. 2000. A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol. Lett. **187**:185–188.

Matagne, A., A. Dubus, M. Galleni, e J. M. Frère. 1999. The β -lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. Nat. Prod. Rep. **16**:1-19.

Matagne, A., J. Lamotte-Brasseur, e J. M. Frère. 1998. Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. Biochem. J. **330**:581-598.

Mazzariol, A., G. Cornaglia, e H. Nikaido. 2000. Contributions of the AmpC β -lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* K-12 to β -lactams. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:1387–1390.

Medeiros, A. 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. Clin. Infec. Dis. **24**:Suppl. S19-S45.

Miriagou, V., L. S. Tzouvelekis, S. Rossiter, E. Tzelepi, F. J. Angulo, e J. M. Whichard. 2003. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:1297–1300.

Moland, E. S., J. A. Black, J. Ourada, M. D. Reisbig, N. D. Hanson, e K. S. Thomson. 2002. Occurrence of newer β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:3837–3842.

Müller, H. E., A. G. Steigerwalt, e D. J. Brenner. 1986. Isolation of *Serratia fonticola* from birds. Zbl. Bakt. Hyg. A. **261**:212–218.

- Müller, H. E., G. R. Fanning, e D. J. Brenner.** 1995. Isolation of *Serratia fonticola* from mollusks. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**:279–284.
- Naas, T., D. Livermore, e P. Nordmann.** 1995. Characterization of an LysR family protein, SmeR from *Serratia marcescens* S6, its effect on expression of the carbapenem-hydrolyzing β -lactamase Sme-1, and comparison of this regulator with other β -lactamase regulators. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:629-637.
- Naas, T., e P. Nordmann.** 1994. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:7693-7697.
- NCCLS** 1995. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standards. M2-A5. Villanova, 5^a ed.
- Nelson, M. R., e C. E. Creutz.** 1995. Comparison of the expression of native and mutant bovine Annexin IV in *Escherichia coli* using four different expression systems. *Protein Expr. Purif.* **6**:132-140.
- Neu, H.** 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science.* **257**:1064-1073.
- Neuwirth, C., E. Siebor, J. M. Duez, A. Pechinot, e A. Kazmierczak.** 1995. Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**:335–342.
- Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* **264**:382-388.
- Nikaido, H.** 2001. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**:215-223.
- Nomura, K., e T. Yoshida.** 1990. Nucleotide sequence of the *Serratia marcescens* SR50 chromosomal ampC β -lactamase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**:295-300.
- Nordmann, P., e L. Poirel.** 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**:321-331.
- Nordmann, P., S. Mariotte, T. Naas, R. Labia, e M. H. Nicolas.** 1993. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:939-946.
- O'Callaghan, C. H., A. Morris, S. M. Kirby, e A. H. Shingler.** 1972. Novel method for detection of β -lactamases using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1**:283–288.
- Okamoto, K., N. Gotoh, e T. Nishino.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1964–1971.

Osano, E., Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, M. Ohta, T. Horii, H. Ito, F. Yoshimura, e N. Kato. 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:71–78.

Ouellette, M., L. Bissonnette, e P. H. Roy. 1987. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 β -lactamase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:7378–7382.

Péduzzi, J., S. Farzaneh, A. Reynaud, M. Barthélémy, e R. Labia. 1997. Characterization and amino acid sequence analysis of a new oxyimino cephalosporin-hydrolyzing class A β -lactamase from *Serratia fonticola* CUV. *Biochim. Biophys. Acta* **1341**:58–70.

Pfyffer, G. E. 1992. *Serratia fonticola* as an infectious agent. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**:199–200.

Philippon, A., J. Dusart, B. Boris, e J. M. Frère. 1998. The diversity, structure and regulation of β -lactamases. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**:341–346.

Pitout, J. D., C. C. Sanders, e W. E. Sanders, Jr. 1997. Antimicrobial resistance with focus on β -lactam resistance in Gram-negative bacilli. *Am. J. Med.* **103**:51–59.

Poirel, L., C. Heritier, V. Tolun, e P. Nordmann. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:15–22.

Poirel, L., I. Thomas, T. Naas, A. Karim, e P. Nordmann. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:622–632.

Poole, K. 2001. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:500–508.

Poole, K. 2004. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**:2200–2223.

Queenan, A. M., C. Torres-Viera, H. S. Gold, Y. Carmeli, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, J. P. Quinn, J. Hindler, A. A. Medeiros, e K. Bush. 2000. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3035–3039.

Raquet, X., J. Lamotte-Brasseur, F. Bouillenne, e J. M. Frère. 1997. A disulfide bridge near the active site of carbapenem hydrolyzing class A β -lactamases might explain their unusual substrate profile. *Proteins.* **27**:47–58.

Rasmussen, B., K. Bush, D. Keeney, Y. Yang, R. Hare, C. O'Gara, e A. Medeiros. 1996. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2080–2086.

- Rasmussen, B. A., e K. Bush.** 1997. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **41**:223–232.
- Richmond, M. H., e R. B. Sykes.** 1973. The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol.* **9**:31-88.
- Rosenberg, A. H., B. N. Lade, D. S. Chui, S. W. Lin, J. J. Dunn, e F. W. Studier.** Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA-polymerase. *Gene* **56**:125–135.
- Rossi, R., A. Montecucco, G. Ciarrocchi, e G. Biamonti.** 1997. Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action. *Nucleic Acids Res.* **25**:2106–2113.
- Saavedra, M. J.** 2000. Susceptibilidade de bactérias isoladas de águas de consumo a antibióticos; caracterização molecular de uma carbapenemase, SfhI. Tese de Doutorado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Saavedra, M. J., L. Peixe, J. C. Sousa, I. Henriques, A. Alves, e A. Correia.** 2003. Sfh-I, a subclass B2 metallo- β -lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2330-2333.
- Sabath, L. D., e E. P. Abraham.** 1966. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem. J.* **98**:11-13.
- Sambrook, J., E. Fritsch, e T. Maniatis.** 1990. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Samuni, A.** 1975. A direct spectrophotometric assay and determination of Michaelis constants for the β -lactamase reaction. *Anal. Biochem.* **63**:17-26.
- Sanders, C. C.** 1992. β -lactamases of Gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. *Clin. Infect. Dis.* **14**:1089-1099.
- Sawai, T., S. Mitsuhashi, e S. Yamagishi.** 1968. Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of β -lactamases in Gram-negative rod bacteria resistant to aminobenzylpenicillin. *Jpn. J. Microbiol.* **12**:423–434.
- Schumann, W., e L. C. S. Ferreira.** 2004. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genet. Mol. Biol.* **27**:442-453.
- Smith, M. E., N. D. Hanson, V. L. Herrera, J. A. Black, T. J. Lockhart, A. Hossain, J. A. Johnson, R. V. Goering, e K. S. Thomson.** 2003. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:711–714.
- Snyder, L., e W. Champness.** 2003. Molecular genetics of bacteria. 2ª ed. ASM Press. Washington, D. C.

- Soler, C., T. Samson, E. Hernandez, V. Hervex, e T. De Ravel.** 2000. *Serratia fonticola*, germe oportuniste: à propos d'une observation chez un immunodéprimé. Méd. Mal Infect. **30**:599-603.
- Sougakoff, W., G. L'Hermite, L. Pernot, T. Naas, V. Guillet, P. Nordmann, V. Jarlier, e J. Delettre.** 2002. Structure of the imipenem-hydrolyzing class A β -lactamase SME-1 from *Serratia marcescens*. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. **58**:267-274.
- Southern, E.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**:503-517.
- Spehr, V., D. Frahm, e T. F. Meyer.** 2000. Improvement of the T7 expression system by the use of T7 lysozyme. Gene. **257**:259-267.
- Spratt, B. G.** 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science. **264**:388-393.
- Stock, I., S. Burak, K. J. Sherwood, T. Gruger, e B. Wiedemann.** 2003. Natural antimicrobial susceptibilities of strains of "unusual" *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, and *S. rubidaea*. J. Antimicrob. Chemother. **51**:865-885.
- Strynadka, N. C., H. Adachi, S. E. Jensen, K. Johns, A. Sielecki, C. Betzel, K. Sutoh e M. N. J. James.** 1992. Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in β -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. Nature. **359**:700-705.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, e J. W. Dubendorf.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direction expression of cloned genes. Methods Enzymol. **185**:60-89.
- Studier, F. W., e B. A. Moffat.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. **189**:113-130.
- Swären, P., L. Maveyraud, X. Raquet, S. Cabantous, C. Duez, J. D. Pedelacq, S. Mariotte-Boyer, L. Mourey, R. Labia, M. H. Nicolas-Chanoine, P. Nordmann, J. M. Frère, e J. P. Samama.** 1998. X-ray analysis of the NMC-A β -lactamase at 1.64-Å resolution, a class A carbapenemase with broad spectrum specificity. J. Biol. Chem. **273**:26714-26721.
- Sykes, R. B., e M. Matthew.** 1976. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. **2**:115-157.
- Sykes, R. B., e M. Matthew.** 1979. Detection, assay and immunology of β -lactamases, p. 17-49. In J. M. T. Hamilton-Miller e J. T. Smith (ed.), *Beta-lactamases*. Academic Press, Ltd., London.
- Therrien, C., e R. C. Levesque.** 2000. Molecular basis of antibiotic resistance and β -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. FEMS Microbiol. Rev. **24**:251-262.

- Thomson, K. S., e E. Moland.** 2000. Version 2000: the new β -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect.* **2**:1225-35.
- Tipper, D. J., e J. L. Strominger.** 1965. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**:1133-1141.
- Van Bambeke, F., Y. Glupczynski, P. Plésiat, J. C. Pechère, e P. M. Tulkens.** 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:1055-1065.
- Vessillier, S., J.-D. Docquier, S. Rival, J.-M. Frère, M. Galleni, G. Amicosante, G. M. Rossolini, e N. Franceschini.** 2002. Overproduction and biochemical characterization of the *Chryseobacterium meningosepticum* BlaB metallo- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1921-1927.
- Videira, A.** 2001. Vectores de clonagem, p. 39-46. *In* Videira, A. Engenharia genética princípios e aplicações. Lidel, Lisboa.
- Vu, H., e H. Nikaido.** 1985. Role of the β -lactam hydrolysis in the mechanism of resistance of a β -lactamase-constitutive *Enterobacter cloacae* strain to expanded-spectrum β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:393-398.
- Waley, S. G.** 1974. A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* **139**:789-790.
- Walsh, C.** 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* **406**:775-781.
- Watanabe, M., S. Iyobe, M. Inoue, e S. Mitsuhashi.** 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:147-151.
- Williams, J. D.** 1999. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **1**:S3-S7.
- Witte, W.** 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science.* **279**:996-997.
- Woodford, N., P. M. Jr. Tierno, K. Young, L. Tysall, M-F. I. Palepou, E. Ward, R. E. Painter, D. F. Suber, D. Shungu, L. L. Silver, K. Inglima, J. Kornblum, e D. M. Livermore.** 2004. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4793-4799.
- Yang, Y., N. Bhachech, e K. Bush.** 1995. Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**:75-84.

Yang, Y., P. Wu, e D. M. Livermore. 1990. Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **34**:755–758.

Yigit, H., A. M. Queenan, J. K. Rasheed, J. W. Biddle, A. Domenech-Sanchez, S. Alberti, K. Bush, e F. C. Tenover. 2003. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -Lactamase KPC-2. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:3881-3889.

Yigit, H., A. Queenan, G. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J. Biddle, C. Steward, S. Alberti, K. Bush, e F. Tenover. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:1151-1161.